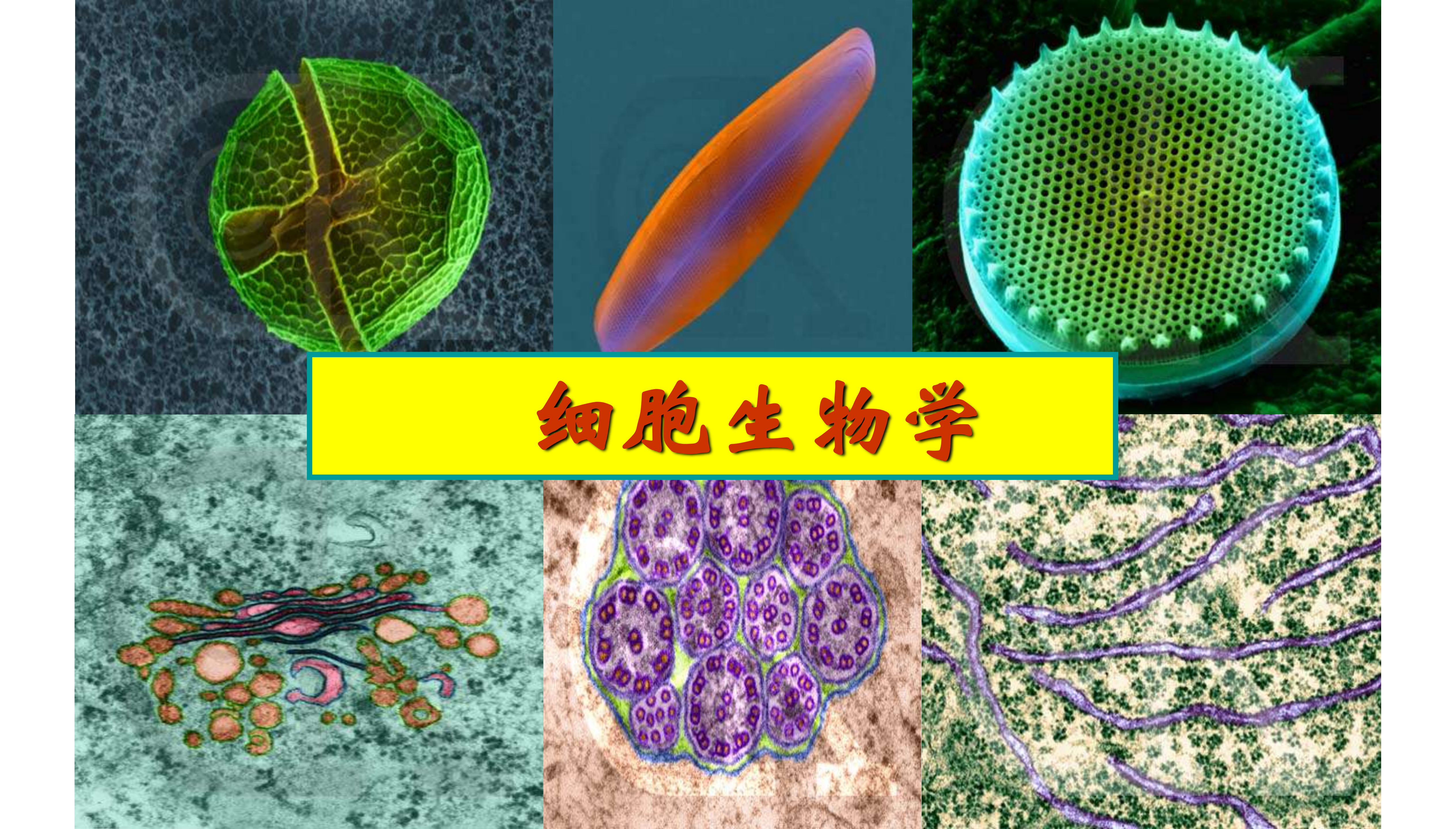

细胞生物学

主要内容

- 细胞结构与功能：
  - ◆生物膜与细胞器的研究——细胞质膜、内膜系统、线粒体等
  - ◆细胞骨架体系的研究——微丝、微管、中间纤维、Septin
  - ◆细胞核、染色体
  - ◆ 细胞连接与细胞外基质

- 细胞重要生命活动：
  - ◆细胞增殖及其调控
  - ◆细胞分化与肿瘤细胞
  - ◆细胞凋亡

第一章 绪 论

细胞生物学概念:

细胞生物学是以细胞为研究对象，从显微水平、亚显微水平、分子水平等三个层次，以动态的观点，研究细胞和细胞器的结构和功能、细胞的起源与进化和各种生命活动规律的学科。



第一章 绪 论

细胞生物学的基石——细胞学说的建立和内容：

- 一切动植物都是由细胞组成的；
- 细胞是生命的基本组成单位；
- 一切细胞只能来自原来的细胞(的分裂)

第一个利用显微镜观察细胞的人：英国人胡克/Robert Hooke

第一个利用显微镜观察到活细胞的人：荷兰学者列文虎克/Leeuwenhoek

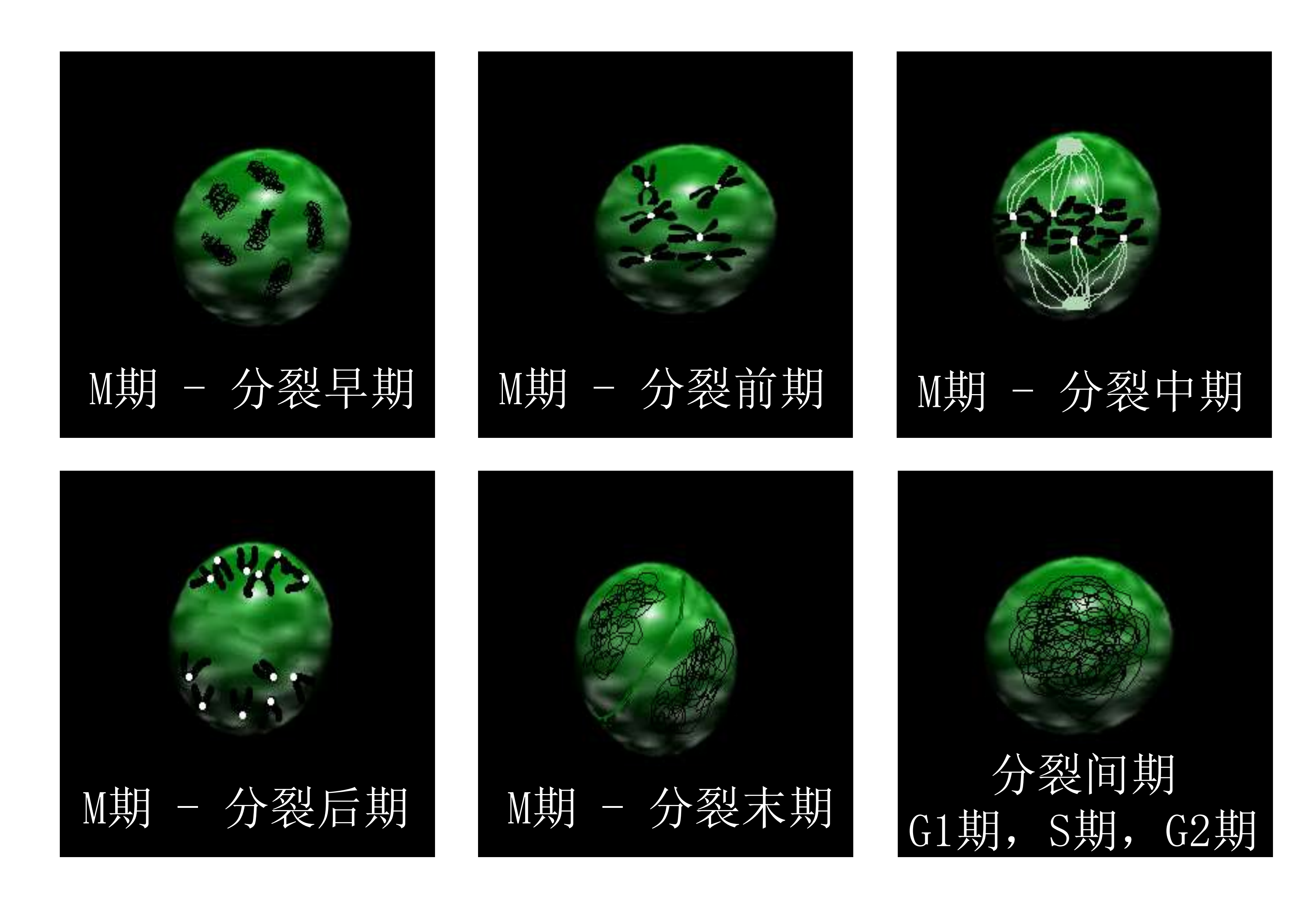
提出者：德国的植物学家施莱登/Schleiden、动物学家施旺/Schwann、病理学家魏尔肖/Rudolf Virchow**进行补充。**

1、细胞学说的建立，很自然地掀起了对多种细胞进行广泛观察与描述的高潮。

- 19世纪的最后25年，各种细胞器和细胞分裂活动相继被发现，这被称为经典细胞学时期。
- 进入20世纪以后，人们开始从简单的观察进入了主动地科学实验，成为实验细胞学时期。

细胞学经典时期（1875~1887）

- 1841年，R. Remak（雷马克，波兰）发现鸡胚血细胞**无丝分裂**
- 1879年，W. Flemming（弗莱明，德国生物学家）发现**有丝分裂**
- 1883年，Van Beneden（比耐登，比利时胚胎学家）发现**减数分裂**，提出遗传的染色体学说



细胞分裂过程

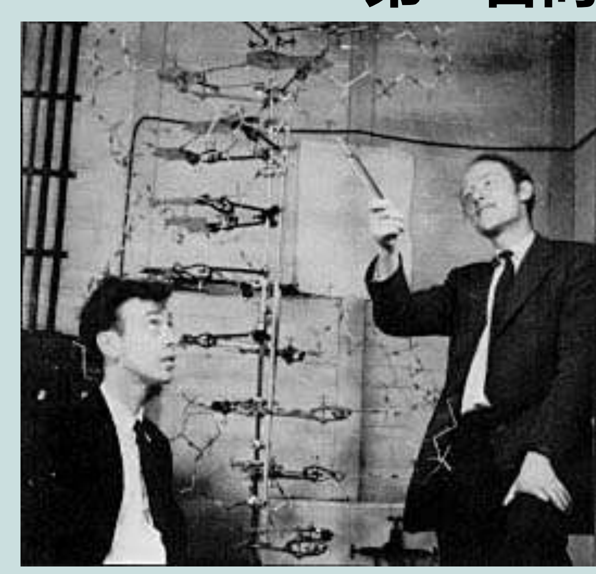
实验细胞学时期（1887~1953）

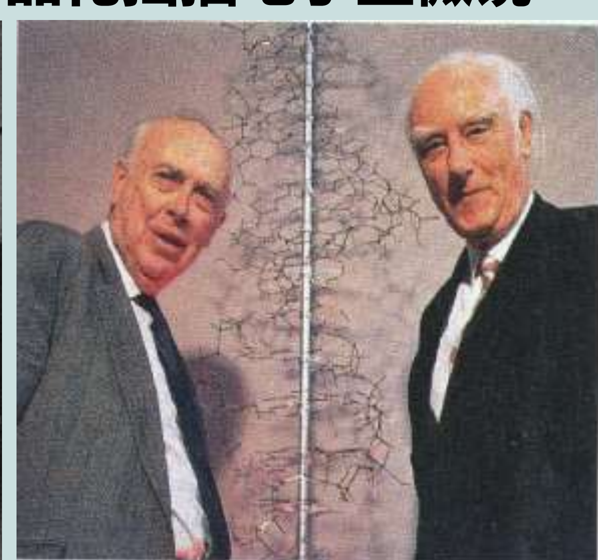
- 1898年，Camillo Golgi（高尔基，意大利医生）发现高尔基复合体
- 1926年，T. Svedberg（斯维德伯格，瑞典物理化学家）发展了第一台分析级超速离心机
- 1938年，Behrens差速离心法分离细胞核
- 1939年，Siemens（西门子公司，德国）生产第一台商品化透射电子显微镜
- 1941年，AH Coons（康恩斯）荧光标记抗体检测细胞抗原
- 1952年，Cey等建立人细胞系

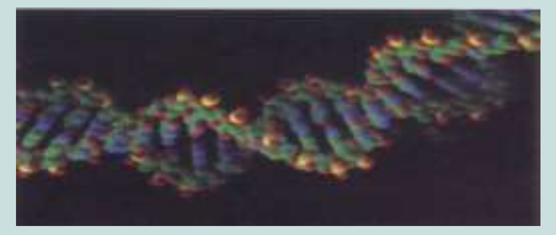
分子细胞生物学时期（1953~ ）

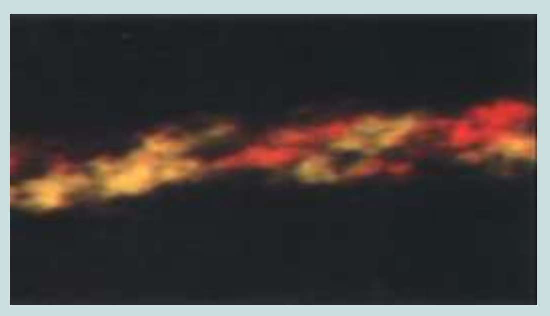
- 1953年，F. Crick（克里克，英国）和J. Watson（沃森，美国），DNA双螺旋结构
- 1955年，H. Eagle（伊格尔，美国），动物细胞培养基成份
- 1957年，M. Meselson（梅塞尔，美国）等, CsCl密度梯度离心技术分离细胞核
- 1965年，Ham（哈姆），无血清培养基；

  第一台商品化扫描电子显微镜







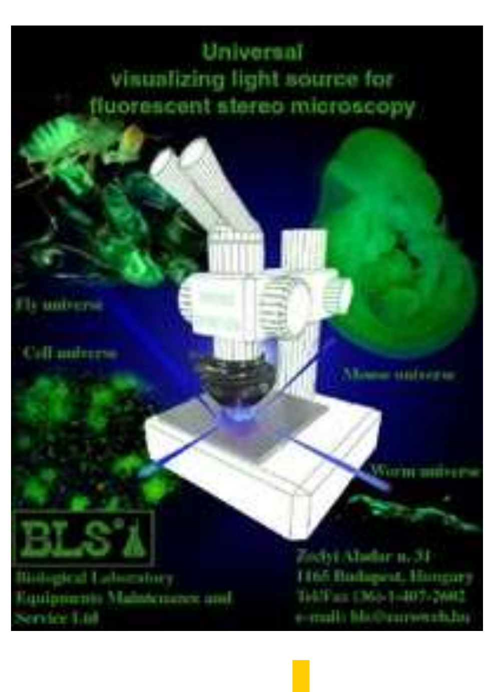


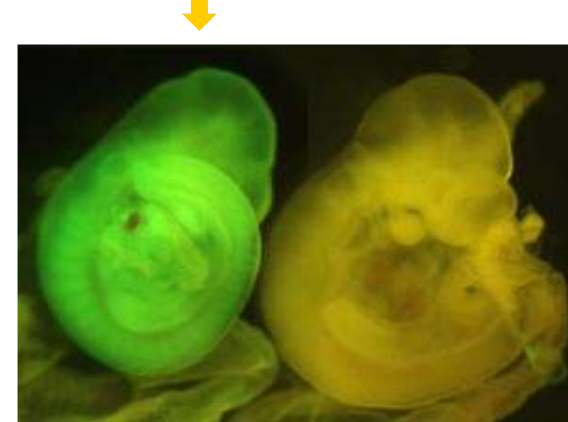
分子细胞生物学时期（1953~　）

- 1981年，转基因小鼠模型建立

  大肠杆菌、酵母、线虫、果蝇和小鼠，称之为人类的五种“模式生物”。

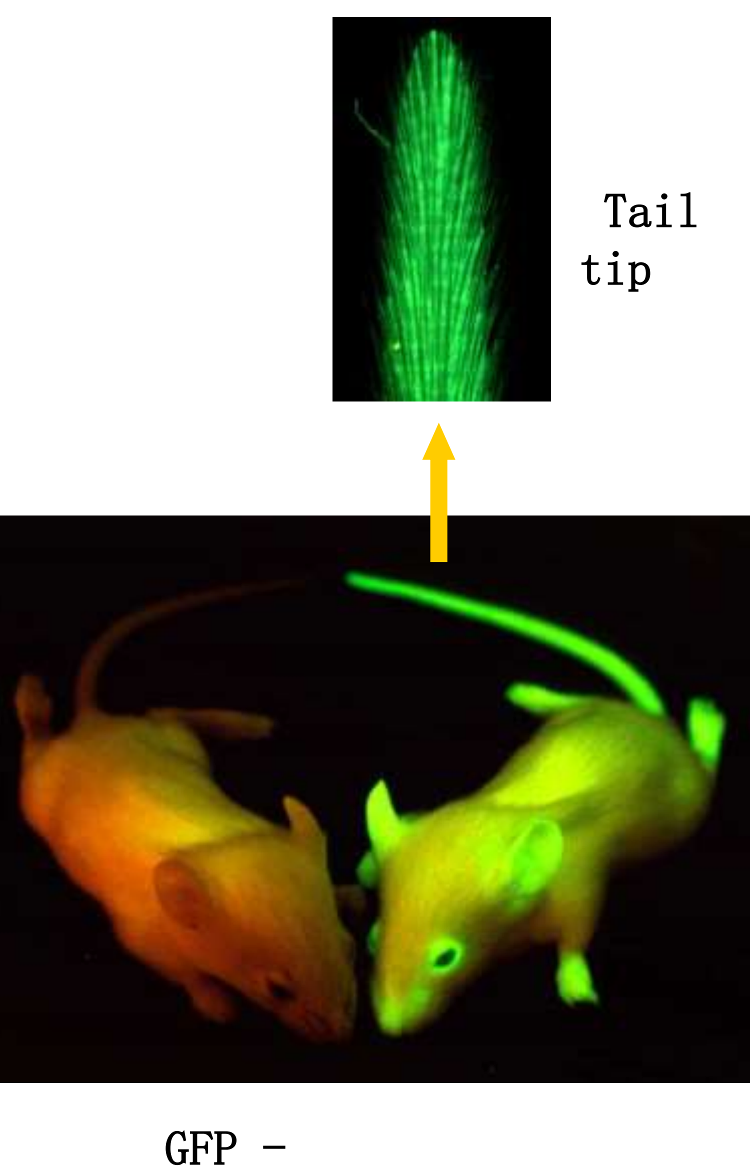
- 1996年，体细胞克隆羊诞生
- 2003年，人类基因组计划序列图绘制成功
- 2009年，全球首例人类胚胎干细胞治疗人体试验获批





GFP +
GFP －

Mouse embryos



Tail tip

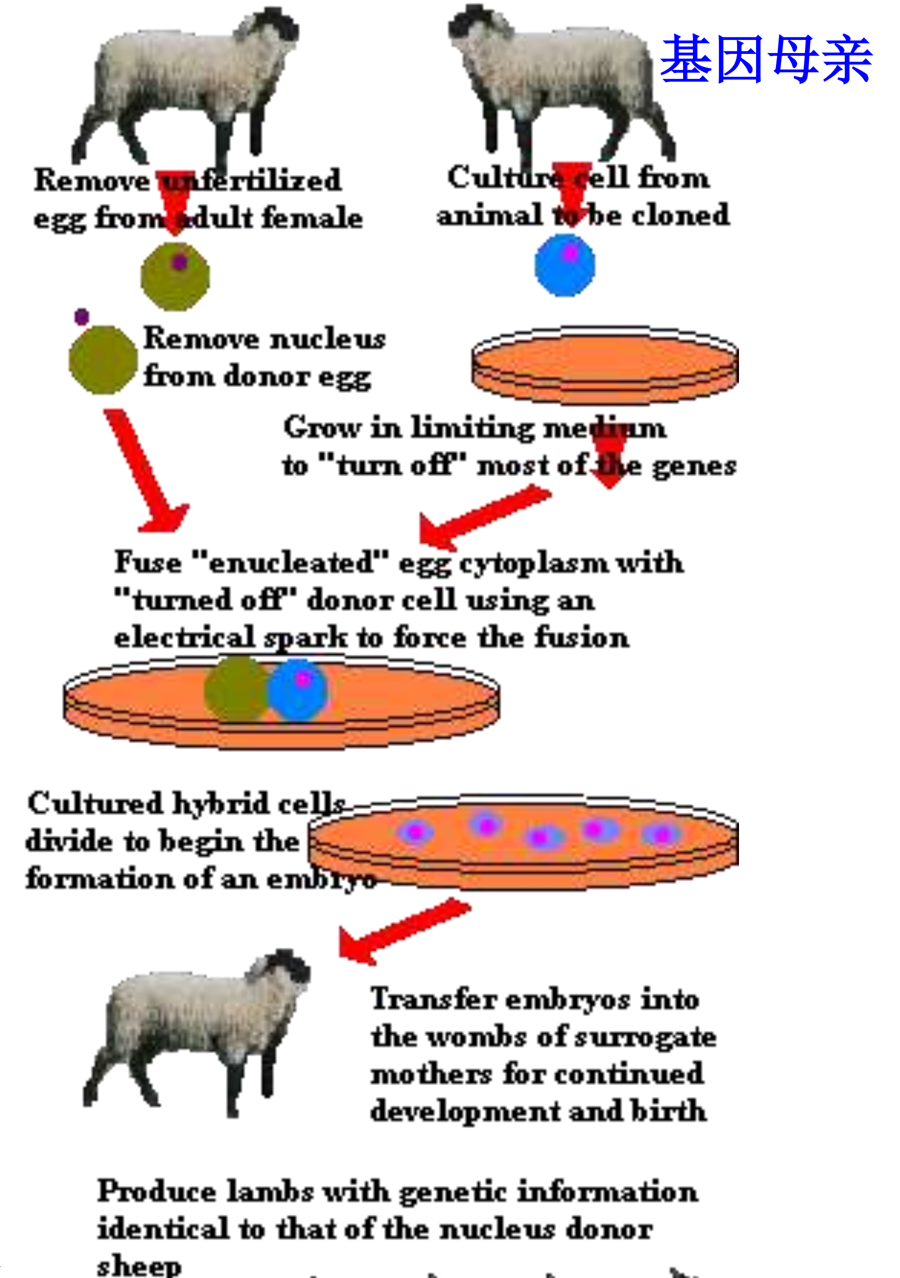
GFP －
GFP +

Transgenic Mice

Cloning sheep



Dolly with her surrogate mother



1996年7月5日，英国Roslin研究所Wilmut教授成功克隆了Dolly羊

human genome project, HGP

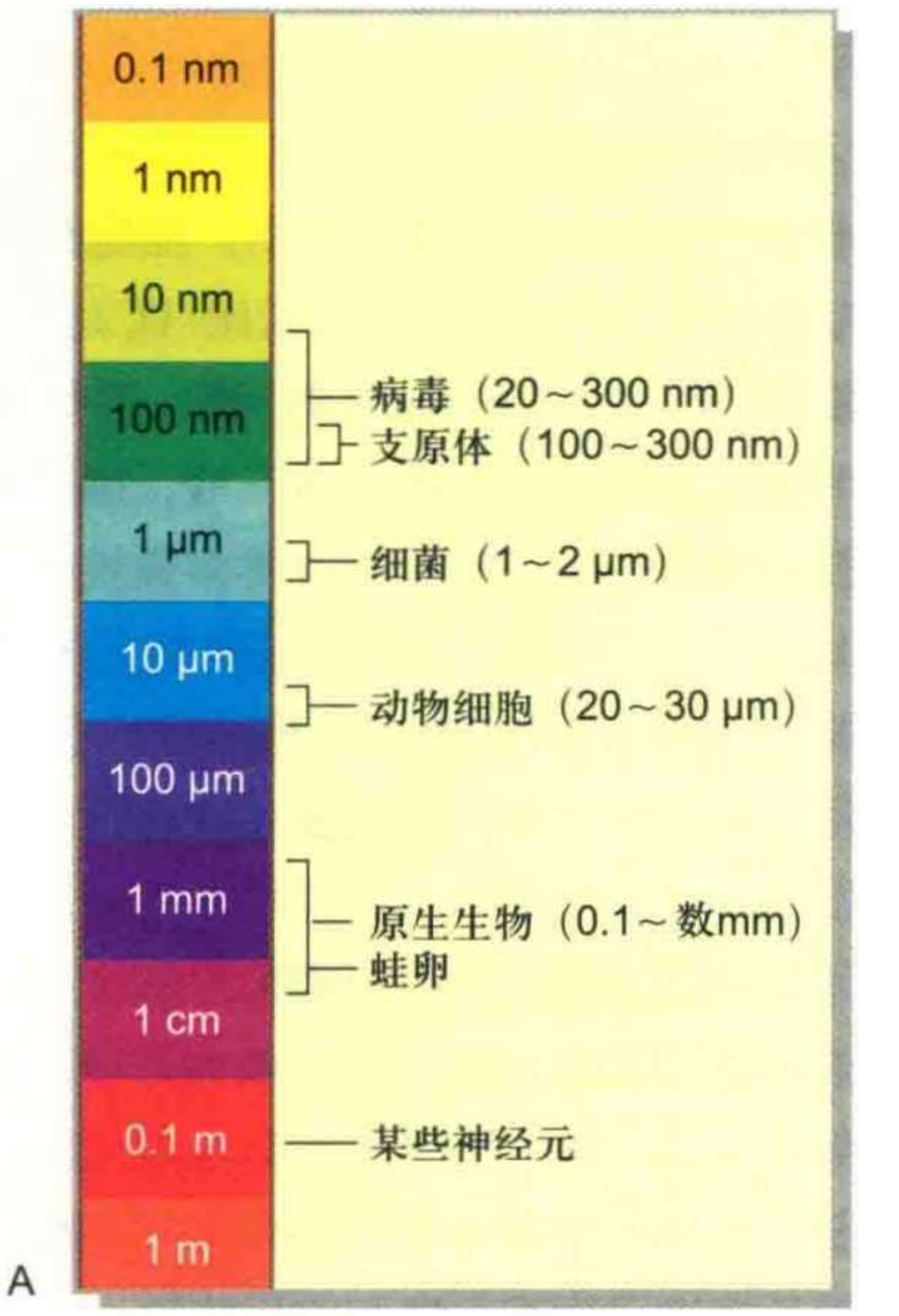


人类基因组计划

由美国于1990年启动，中国、英国、法国、德国和日本参加。我国于1993年加入该计划，承担其中1%的任务，即人类3号染色体短臂上约30Mb的测序任务。

2、细胞的大小

- 细胞的大小是细胞的重要特征，各类细胞的大小有一定规律。
- 一般而言，按细胞平均直径粗略计算，支原体细胞比最小的病毒大10倍，细菌细胞比支原体大10倍，而多数动植物细胞比细菌大10多倍些，原生动物细胞又比一般动植物细胞大10倍。



- 支原体是最小最简单的细胞，只有唯一的细胞器核糖体，直径只有0.1-0.3μm。
- 蓝细菌是已知的世界上最古老的生命体。
- 自然界中最小最简单的生命体是病毒。

  根据核酸类型不同，病毒可以分为两大类：DNA病毒、RNA病毒

  根据宿主范围可分为: 动物病毒、植物病毒、细菌病毒（噬菌体）等。

- 一个细胞生存和增殖必须具备的结构装置与机能是：

  1). 生物膜系统；

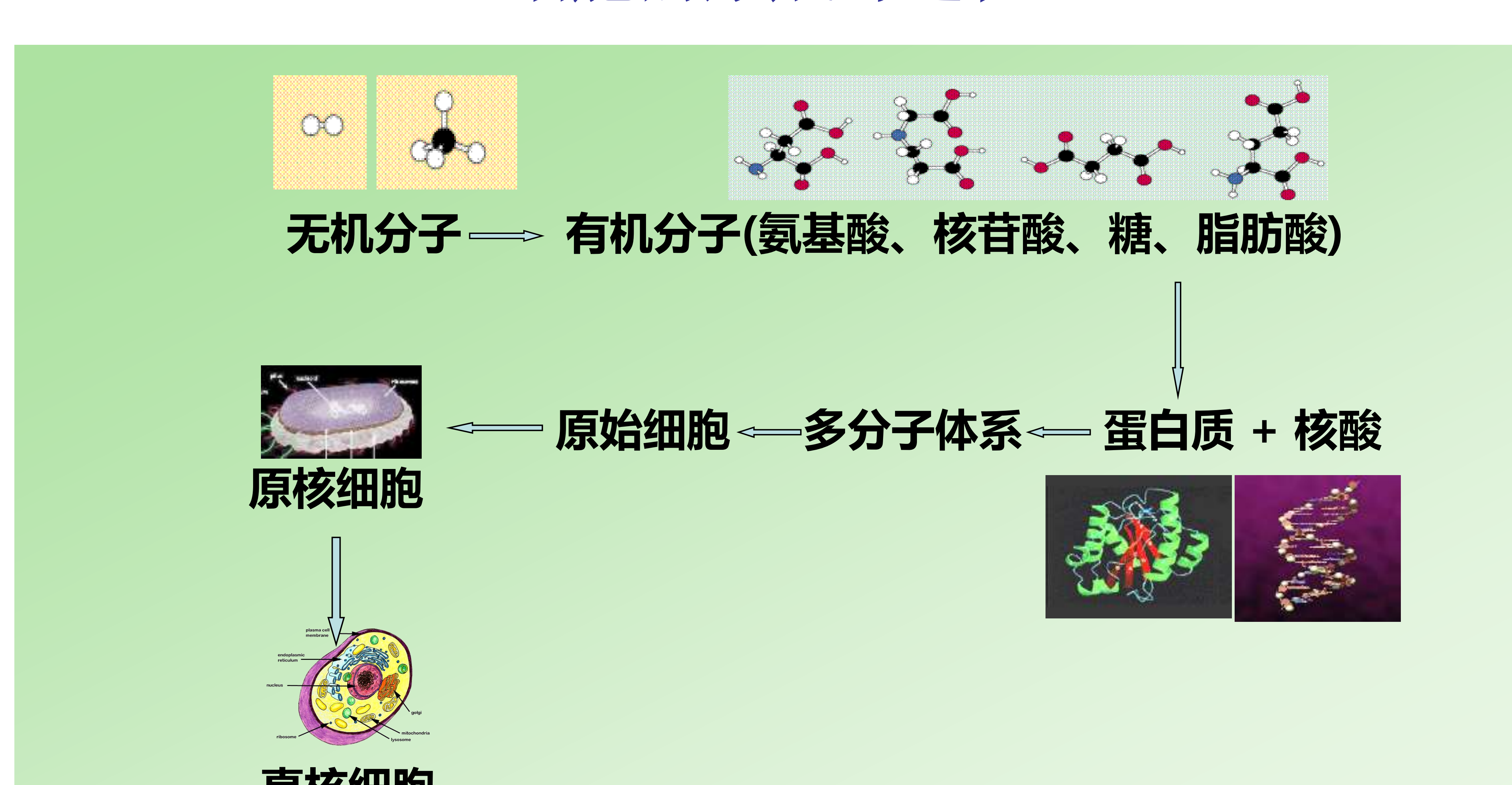
  2). 遗传信息表达结构体系；

  3). 细胞骨架系统。

3、细胞是生命活动的基本单位：

- 一切有机体都是由细胞构成，细胞是构成有机体的基本单位；
- 细胞具有独立的、有序的自控代谢体系，细胞是代谢与功能的基本单位；
- 细胞是有机体生长与发育的基础；
- 细胞是遗传的基本单位，细胞具有遗传的全能性；
- 细胞是生命起源的标志，是生物演化的起点。没有细胞就没有完整的生命。

细胞的形成与进化


无机分子
有机分子(氨基酸、核苷酸、糖、脂肪酸)
蛋白质 + 核酸
多分子体系
原始细胞
原核细胞
真核细胞
plasma cell membrane
endoplasmic reticulum
nucleus
ribosome
golgi
mitochondria
lysosome

细胞的类型与生物界的类群：

- 在原核细胞中有一类群，它们的遗传信息表达系统与其他的原核细胞差异相当大，反而与真核细胞更为接近。
- 于是人们把这类细胞从原核细胞中独立出来，另立一个类群，称为古核细胞(即古细菌)，由古核细胞所构成的生物称古核生物。
- 3域6界。

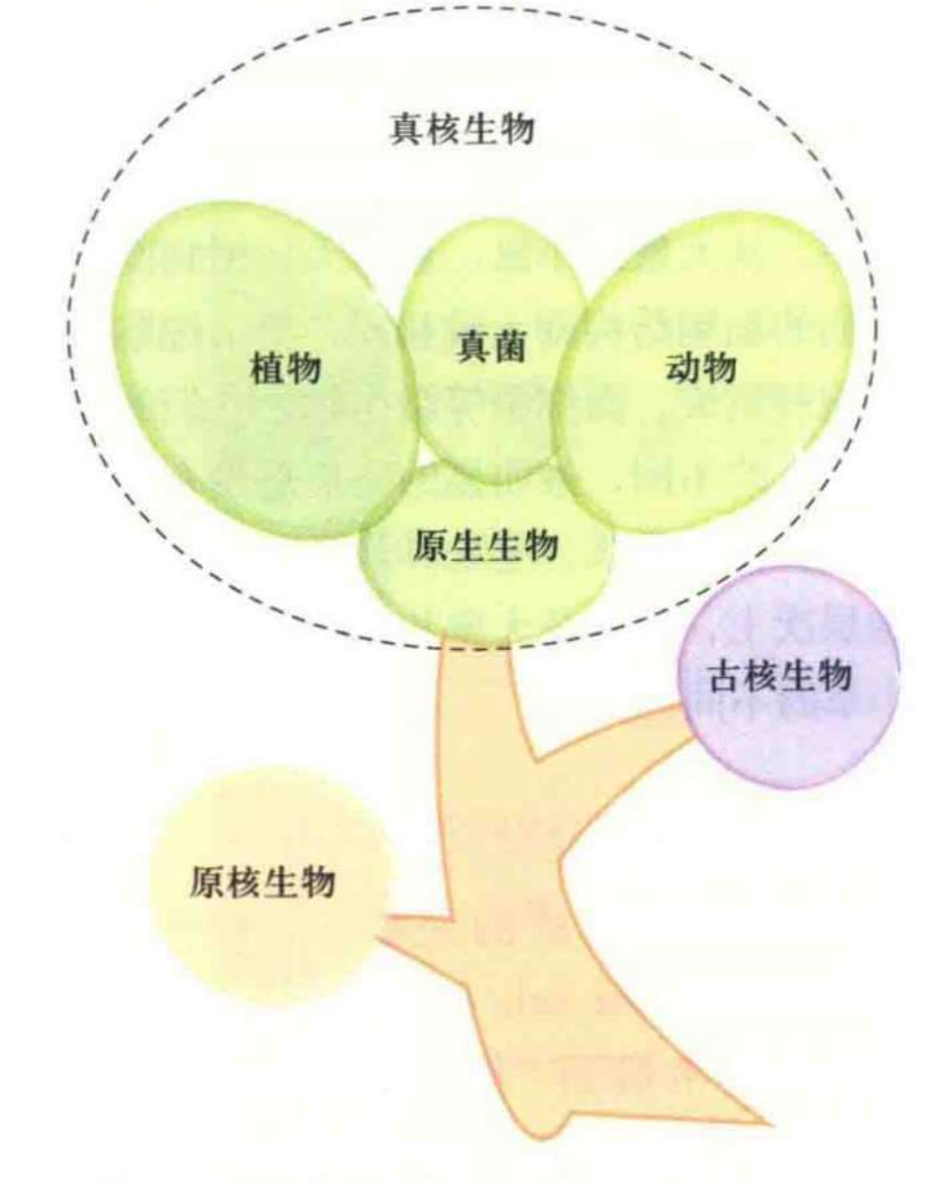
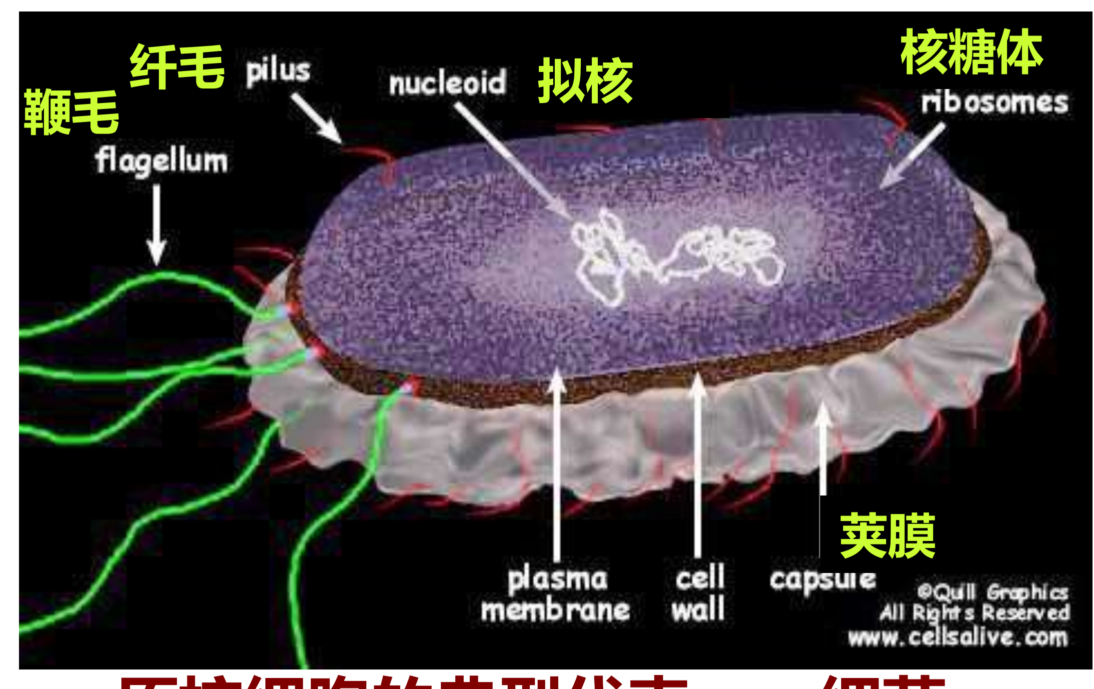


图 1-3　生物界的基本类群

所有生物起源于共同的祖先，最终演化出 3 种基本的的细胞类型和构成生物类群的 6 个界。古核细胞与真核细胞在进化上的亲缘关系更近些。

原核细胞（prokaryotic cell）

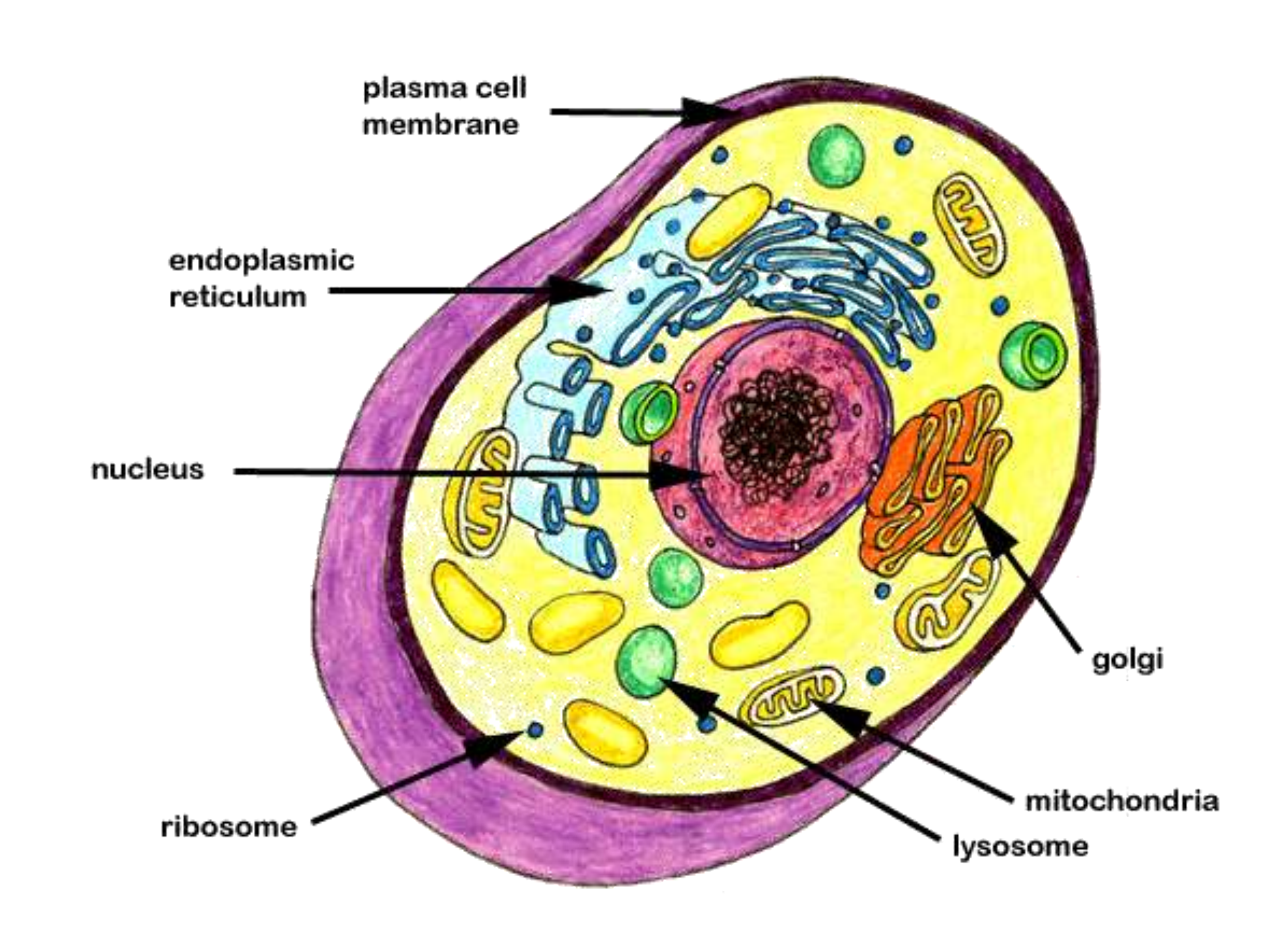
- 结构简单，仅由细胞膜包绕
- 细胞膜外有坚韧的细胞壁
- 在细胞质内含有DNA区域，称为拟核（nucleoid）
- 一条裸露DNA链，不与蛋白质结合
- 除含有核糖体外，无其他膜性细胞器



原核细胞的典型代表——细菌

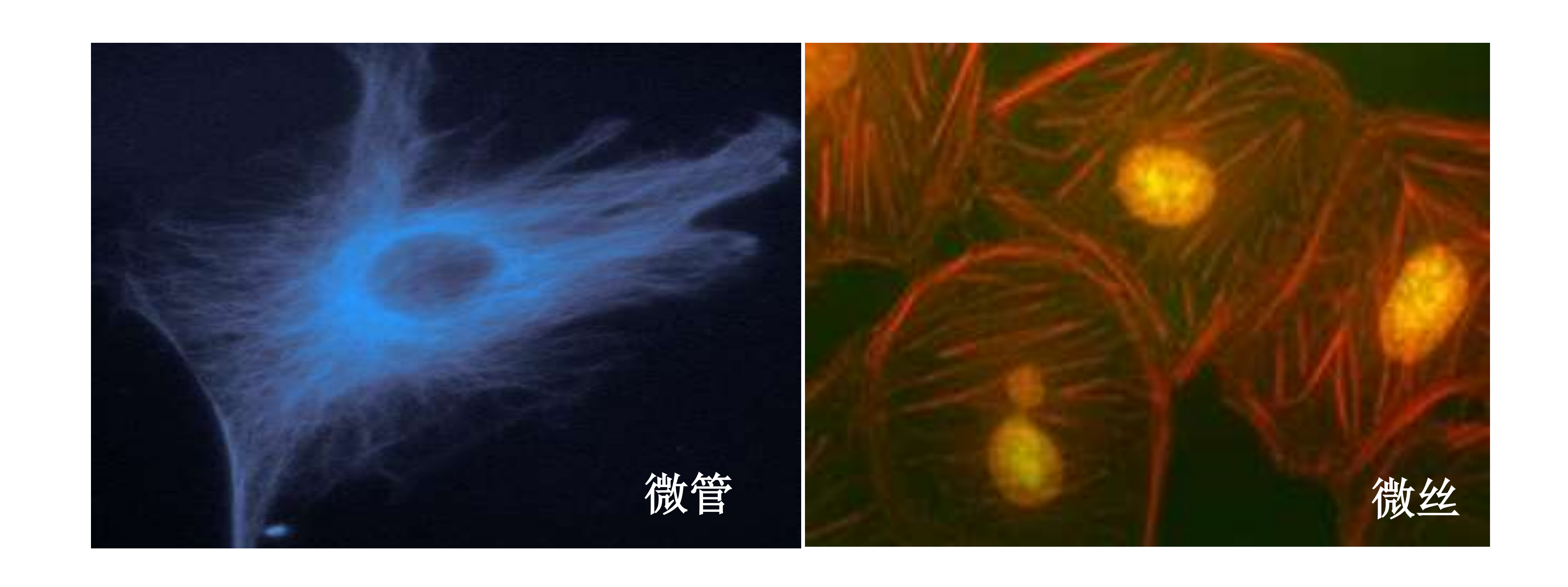
真核细胞（eukaryotic cell）

1）生物膜系统:以生物膜为基础而形成的膜性结构或细胞器，包括细胞膜、内质网、高尔基复合体、线粒体、溶酶体、过氧化物酶体及核膜等。



真核细胞（eukaryotic cell）

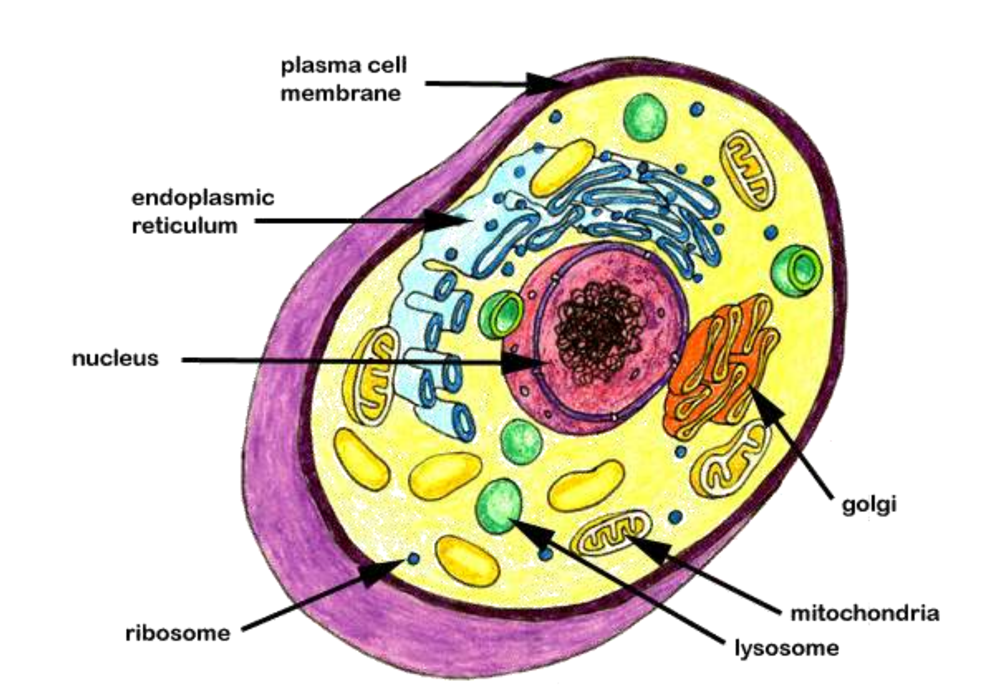
2）细胞骨架系统：由一系列纤维状蛋白组成的网状结构系统，包括细胞质骨架和核骨架。



真核细胞（eukaryotic cell）

3）细胞质溶胶：在细胞质中除内膜系统核细胞骨架等结构外，其余的则为可溶性的细胞质溶胶。成分：蛋白质、多糖、脂蛋白、RNA、水、无机离子等。

4）遗传信息表达系统：指储存遗传信息的DNA是以与蛋白质结合形式而存在的，并被包装成为高度有序的染色质结构包围在细胞核中。



特征	原核细胞	古核细胞	真核细胞
细胞质膜	有（多功能性）	有（多功能性）	有
核膜	无	无	有
染色体	由一个（少数多个）环状 DNA 分子构成的单个染色体，DNA 不与或很少与蛋白质结合	由环状 DNA 分子构成的单个染色体，DNA 与与组蛋白结合	2 个染色体以上，染色体由线状 DNA 与蛋白质组成
核仁	无	无	有
核糖体	70S（包括 50S 与 30S 的大小亚基），对氯霉素敏感	70S（包括 50S 与 30S 的大小亚单位），对氯霉素不敏感	80S（包括 60S 与 40S 的大小亚基），但对氯霉素不敏感
翻译起始	fMet	Met	Met
膜质细胞器	无	无	有
核外 DNA	细菌具有裸露的质粒 DNA	有质粒	线粒体 DNA，叶绿体 DNA
细胞壁	主要由肽聚糖形成	由蛋白质形成，不含肽聚糖	如有，成分为纤维素与果胶（植物）或几丁质（真菌）
细胞骨架	无	无	有
细胞增殖（分裂）方式	二分裂	二分裂	有丝分裂为主

两类代表性的原核细胞：细菌与蓝藻

- 原核生物一般体积小，但其繁殖快，在地球上分布的广度与对生态环境的适应性比真核生物大得多。
- 但 取得的选择优势是有代价的——它们的基因量少，基因表达调控简单，无法进行复杂的细胞分化，也就难以形成多细胞生命体。
- 因此它们虽然选择优势明显，却只能占有非常有限的生态位，导致物种数目远少于真核生物。

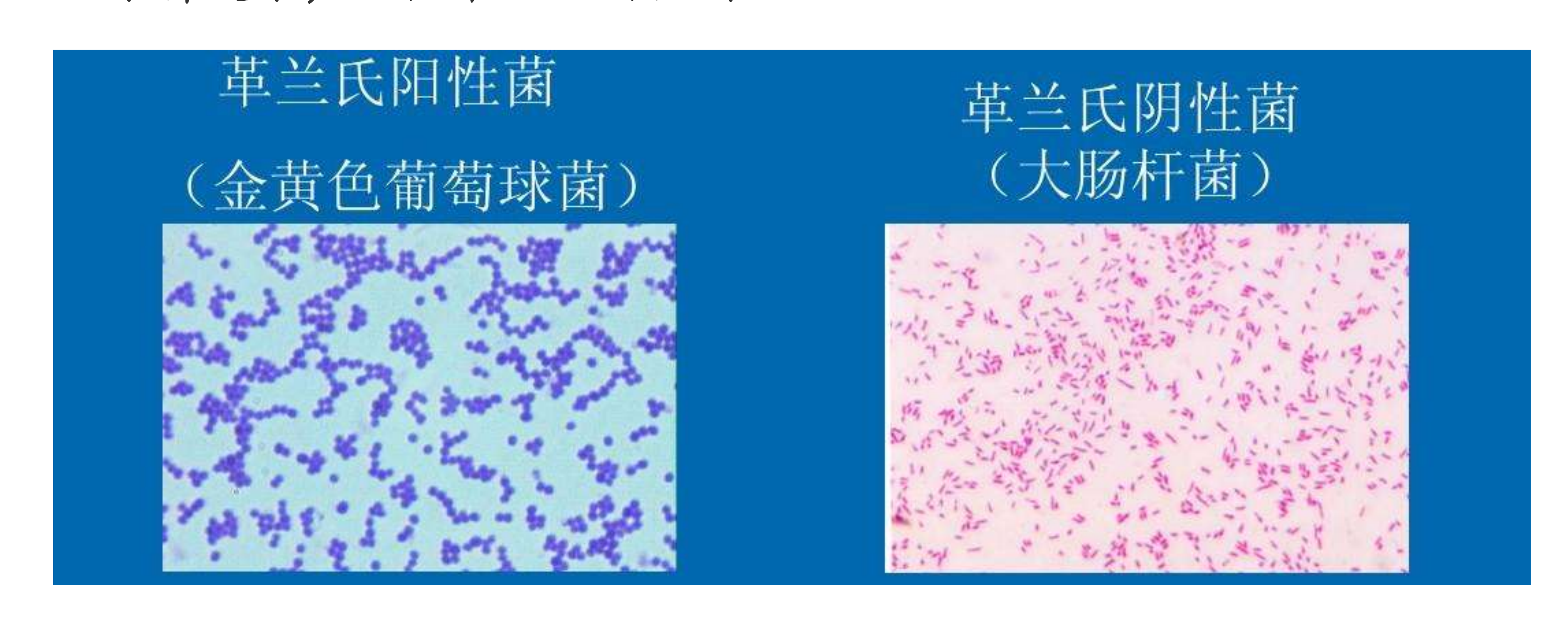
1. 细菌

（1）所有细菌的细胞壁具有的共同成分是肽聚糖，**青霉素可抑制肽聚糖的合成。**

- 革兰氏阳性菌 (G*) 因细胞壁的肽聚糖含量极高，故对青霉素很敏感；
- 革兰氏阴性菌 (G) 由于肽聚糖含量很少，对青霉素不敏感。

革兰氏染色法：（初染→媒染→脱色→复染）

通过结晶紫初染和碘液媒染后，在细胞壁内形成了不溶于水的结晶紫与碘的复合物，革兰氏阳性菌由于其细胞壁较厚、肽聚糖网层次较多且交联致密，能把结晶紫与碘复合物牢牢留在壁内，使其仍呈紫色；而革兰氏阴性菌因其细胞壁薄、外膜层类脂含量高、肽聚糖层薄且交联度差，在通过乙醇脱色后仍呈无色，再经沙黄等红色染料复染，就使革兰氏阴性菌呈红色。



1. 细菌

（2）细菌基因组与遗传信息表达体系：

- 一般有一个复制起始点，复制时细菌DNA环附在细菌质膜上作为支持点，复制不受细胞分裂周期的限制，可以连续进行。（大肠杆菌复制40min，增殖20min一代）
- 细菌的DNA复制、转录与翻译的结构装置在空间上没有分隔，可以同时进行，这是细菌乃至整个原核细胞与真核细胞最显著的差异之一。

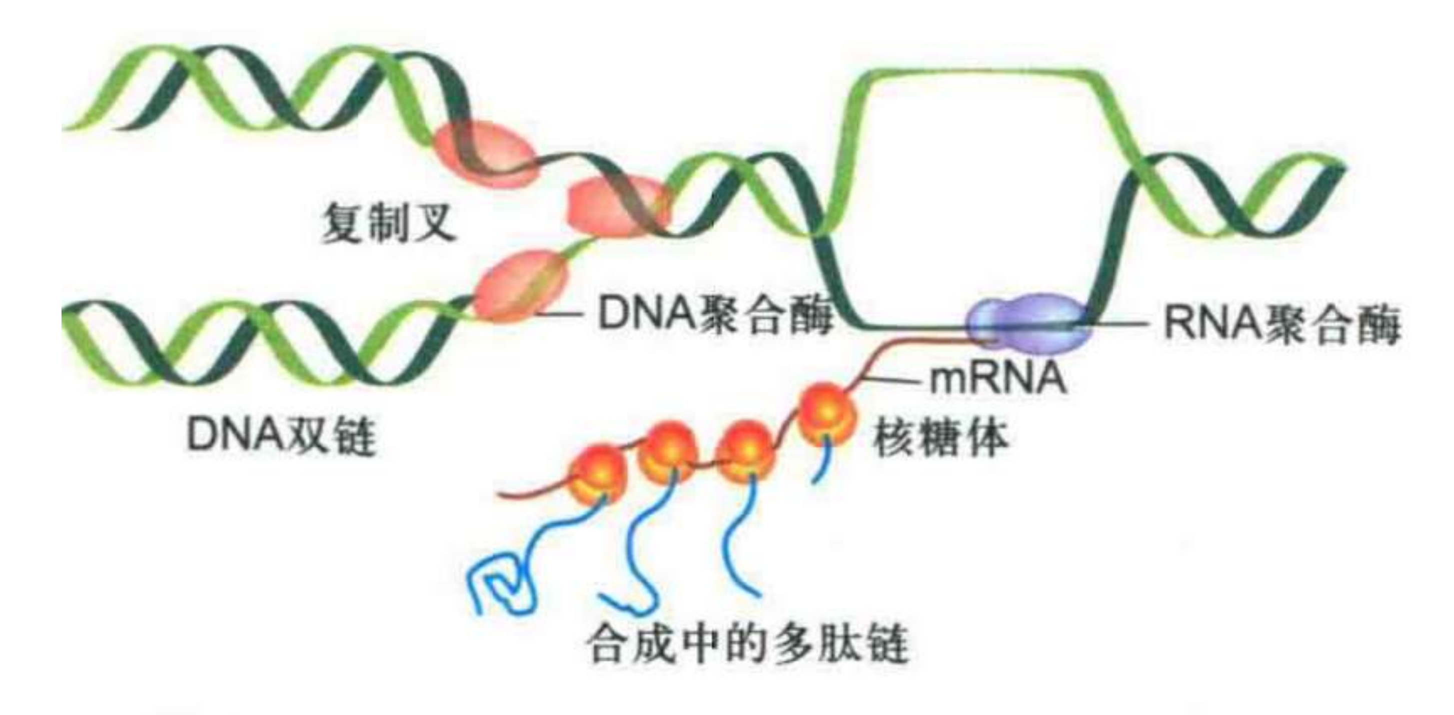
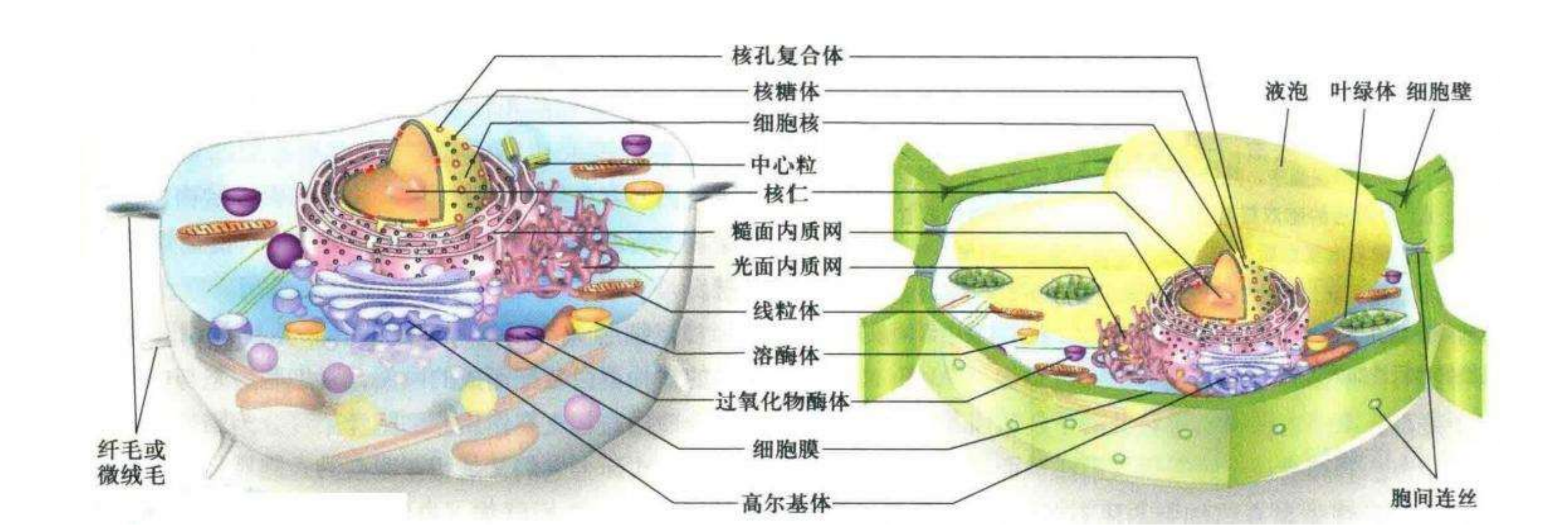


图 1-5　细菌的复制、转录和翻译连续进行的示意图

2. 植物细胞

液泡:

- 植物细胞常常同时存在两种不同的液泡，即中性的储存蛋白质的液泡和酸性的裂解液泡。
- 前者是植物细胞的代谢库，起调节细胞内环境的作用；后者含有水解酶，能够降解衰老的细胞器，起着类似溶酶体的功能。
- 中央大液泡是随着细胞的生长，由小液泡合并与增大而形成的。



3. 病毒

RNA病毒的种类，可以根据其mRNA的来源不同，分为四种：

单股正链RNA病毒（+ssRNA）

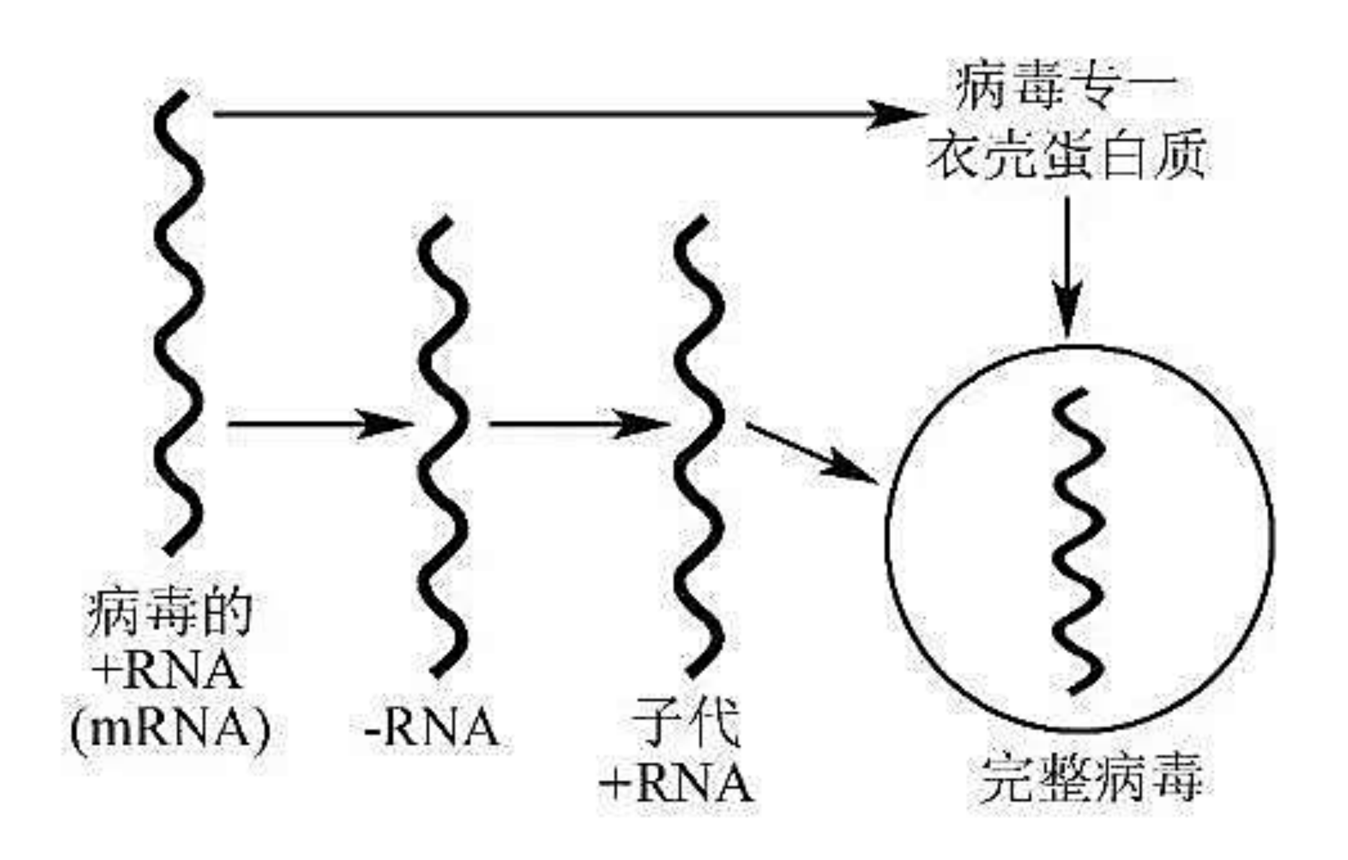
单股负链RNA病毒（-ssRNA）

逆转录病毒

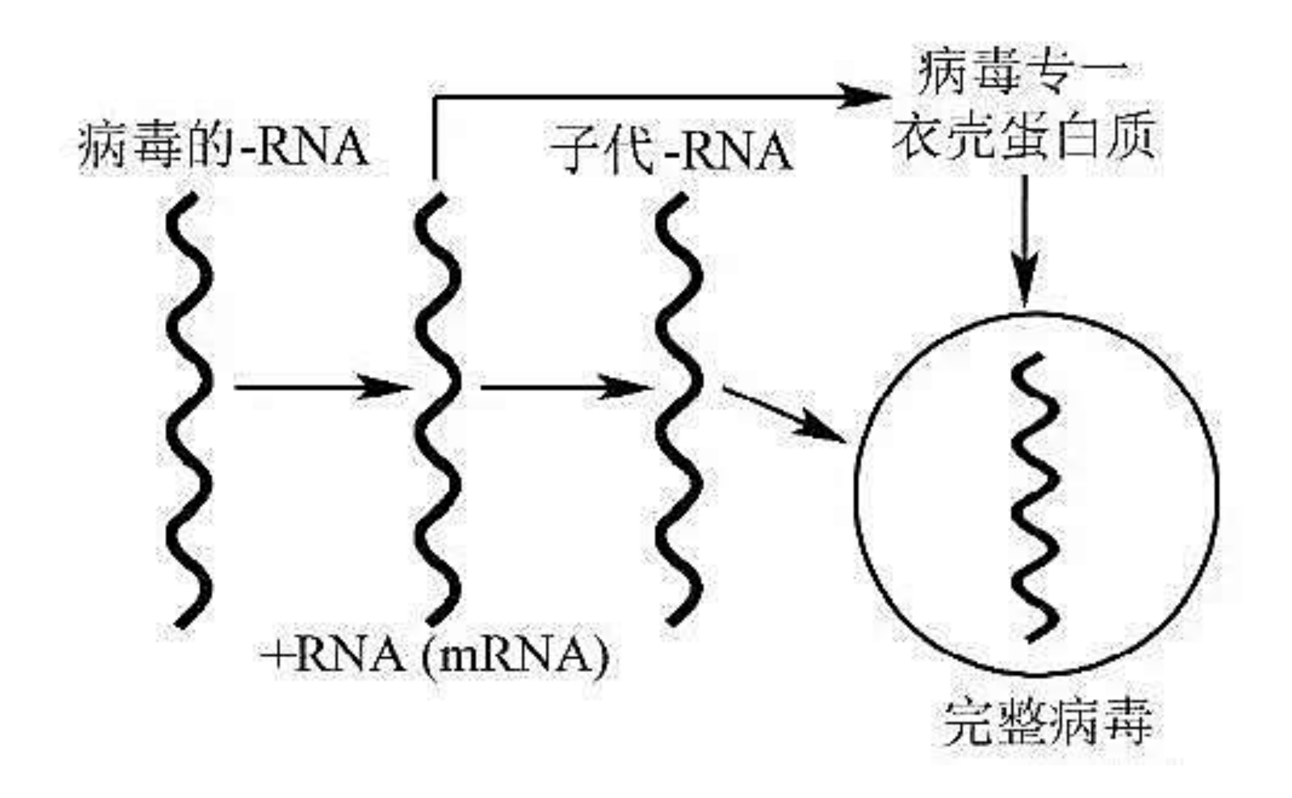
双链RNA病毒（dsRNA）

RNA病毒	单股正链RNA病毒	冠状病毒科	SARS－CoV、SARS－CoV－2
		小RNA病毒科	脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒
		星状病毒科	星状病毒
		杯状病毒科	诺如病毒
		被膜病毒科	风疹病毒
		黄病毒科	丙型肝炎病毒、日本脑炎病毒、登革热病毒、黄热病病毒
	单股负链RNA病毒	丝状病毒科	埃博拉病毒、马尔堡病毒
		负黏病毒科	麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒
		正黏病毒科	甲型、乙型流感病毒
		布尼亚病毒科	汉坦病毒
		弹状病毒科	狂犬病毒
	逆转录病毒	逆转录病毒科	人类免疫缺陷病毒、人类T细胞白血病病毒
	双链RNA病毒	呼肠孤病毒科	轮状病毒

（1）正链RNA病毒： 正链RNA病毒的RNA与mRNA相似，可以直接被宿主细胞翻译成蛋白质，如脊髓灰质炎病毒、甲肝病毒、丙肝病毒、寨卡病毒、烟草花叶病毒(TMV)等。其遗传信息流动方向可表示为：



（2）负链RNA病毒：负链RNA病毒进入寄主后不能直接作为mRNA，而是先以负链RNA为模板由转录酶转录出与-RNA互补的+RNA，再以这个互补+RNA作为mRNA翻译出遗传密码所决定的蛋白质。如流感病毒、SARS病毒、狂犬病毒、埃博拉病毒等。其遗传信息流动方向可表示为：



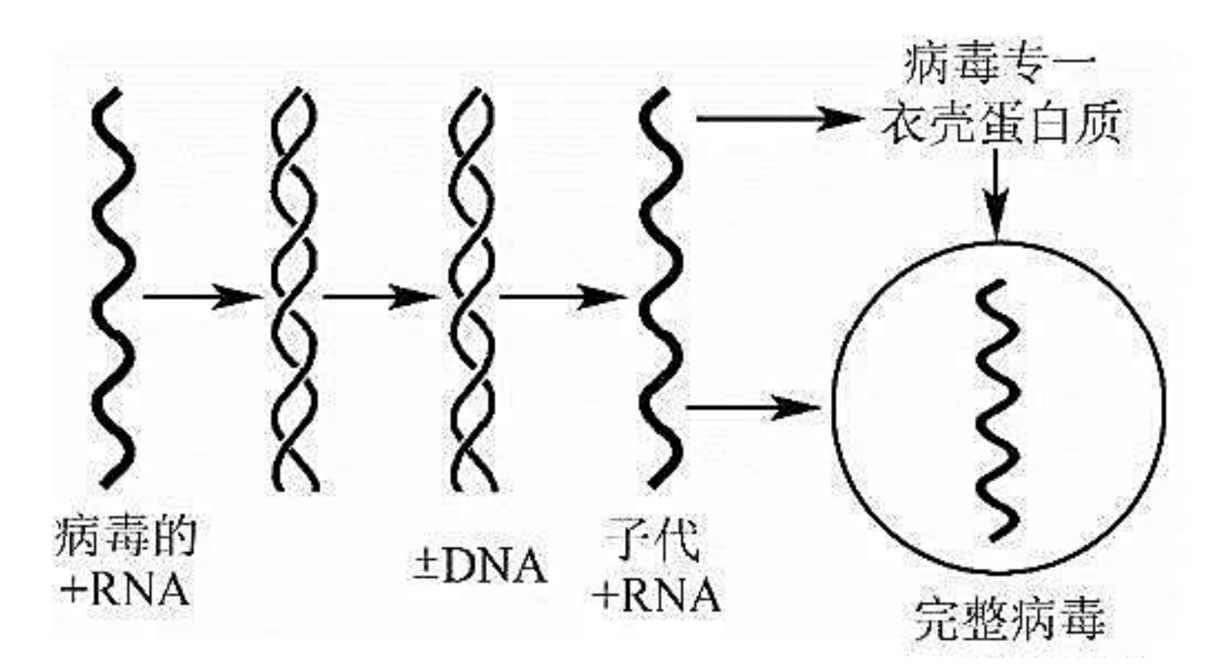
（3）逆转录RNA病毒：逆转录RNA病毒含有单股正链RNA。其复制的特点是：

①单链RNA的基因组必须反转录成双链DNA；

②随后这种DNA必须整合到细胞DNA中；

③整合状态长期持续下去并传给子代细胞，也可能转录RNA，生产子代病毒或使细胞转化；

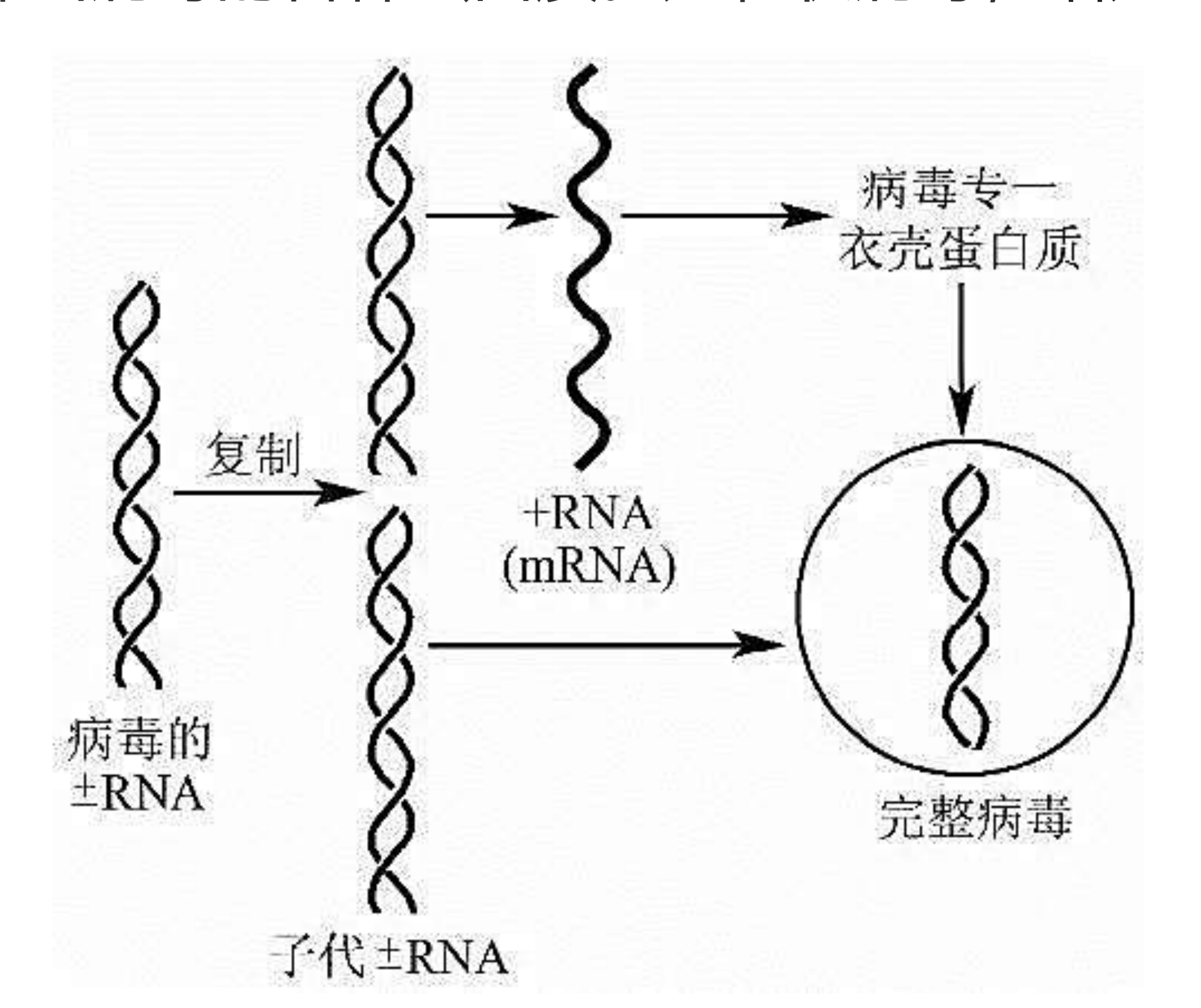
④感染细胞不会死亡，分裂不停止。也就是说这类病毒的潜伏期很长，有时可以终身带毒而不发病。该类病毒通常引起人和动物的肿瘤，其中包括造成人免疫性缺陷症的艾滋病病毒、白血病病毒等。其遗传信息流动方向可表示为：



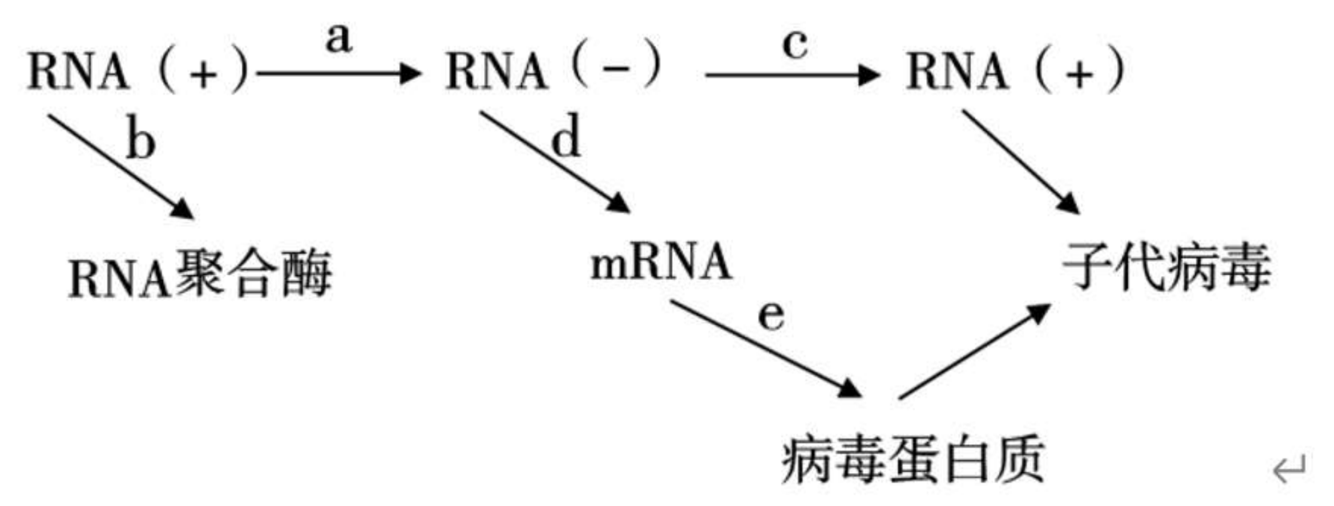
（4）双链RNA病毒：双链RNA病毒含有双链RNA。

①复制：通过半保留复制的方式复制出子代双链RNA；

②表达：利用双链RNA中的一条-RNA作为模板产生+RNA，即mRNA，以mRNA作为模板翻译出病毒的各种蛋白质。如轮状病毒，增殖过程如下图：



24．2020 年全球发生了一场严重的新冠肺炎疫情，其病原体 2019-nCoV 是一种具有包膜、单条正链 RNA（+）的冠状病毒，该病毒在宿主细胞内的增殖过程如图所示，a-e 表示相应的生理过程。请回答：



(1)图中 a 过程需要的酶是__________，该过程中的碱基互补配对的方式有__________。

(2)图中代表翻译过程的是________________（填字母）。

(3)新冠病毒侵入宿主细胞的方式之一是通过病毒的包膜与宿主细胞膜融合，病毒粒子进入细胞内部。由此可以推断，病毒包膜的成分除蛋白质外，还有__________________________。病毒的这种侵入细胞的方式与细胞膜的______________（结构特点）有关。

3. 病毒

RNA病毒的种类，可以根据其mRNA的来源不同，分为四种：

单股正链RNA病毒（+ssRNA）

单股负链RNA病毒（-ssRNA）

逆转录病毒

双链RNA病毒（dsRNA）

RNA病毒	单股正链RNA病毒	冠状病毒科	SARS－CoV、SARS－CoV－2
		小RNA病毒科	脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒
		星状病毒科	星状病毒
		杯状病毒科	诺如病毒
		被膜病毒科	风疹病毒
		黄病毒科	丙型肝炎病毒、日本脑炎病毒、登革热病毒、黄热病病毒
	单股负链RNA病毒	丝状病毒科	埃博拉病毒、马尔堡病毒
		负黏病毒科	麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒
		正黏病毒科	甲型、乙型流感病毒
		布尼亚病毒科	汉坦病毒
		弹状病毒科	狂犬病毒
	逆转录病毒	逆转录病毒科	人类免疫缺陷病毒、人类T细胞白血病病毒
	双链RNA病毒	呼肠孤病毒科	轮状病毒

第二章　细胞生物学研究方法

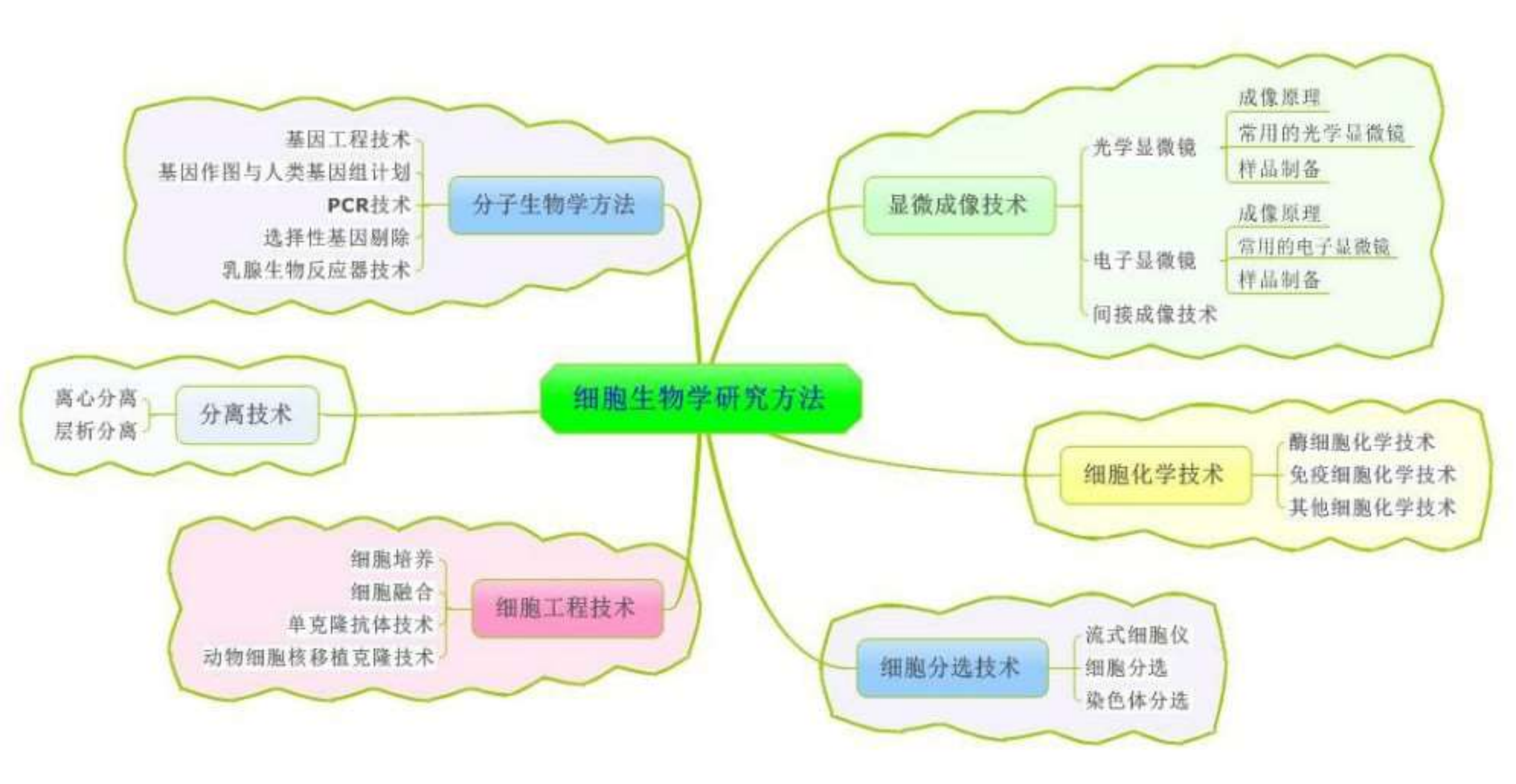
第一节　细胞形态结构的观察方法

第二节　细胞及其组分的分析方法

第三节　细胞培养、细胞工程

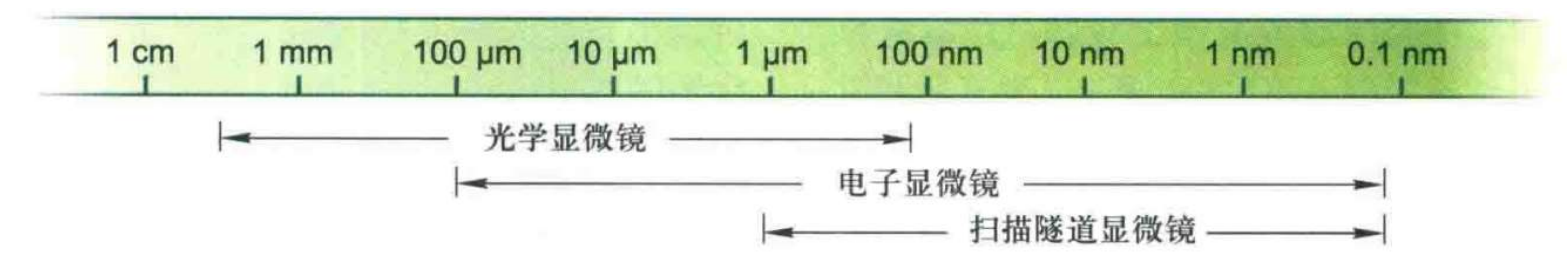
第四节　细胞及生物大分子的动态变化

第五节　模式生物与功能基因组的研究



细胞生物学研究方法
分子生物学方法
基因工程技术
基因作图与人类基因组计划
PCR技术
选择性基因剔除
乳腺生物反应器技术
分离技术
离心分离
层析分离
细胞工程技术
细胞培养
细胞融合
单克隆抗体技术
动物细胞核移植克隆技术
显微成像技术
光学显微镜
成像原理
常用的光学显微镜
样品制备
电子显微镜
成像原理
常用的电子显微镜
样品制备
间接成像技术
细胞化学技术
酶细胞化学技术
免疫细胞化学技术
其他细胞化学技术
细胞分选技术
流式细胞仪
细胞分选
染色体分选

- 肉眼的分辨率一般只有0.2mm，很难识别单个细胞；
- 光学显微镜的分辨率可达0.2μm，借此发现了细胞；
- 电子显微镜分辨率高达0.2nm ， 将细胞的超微结构展现在人们面前。
- 光学显微镜、电子显微镜，除了它们因提高分辨率而称之为显微镜这一共性外，在其成像原理、仪器构造以及使用和操作方法等方面，几乎没有任何共同之处。



几种显微镜可观察的样品大小（箭头之间的范围）及其分辨能力（右侧箭头所指位置）

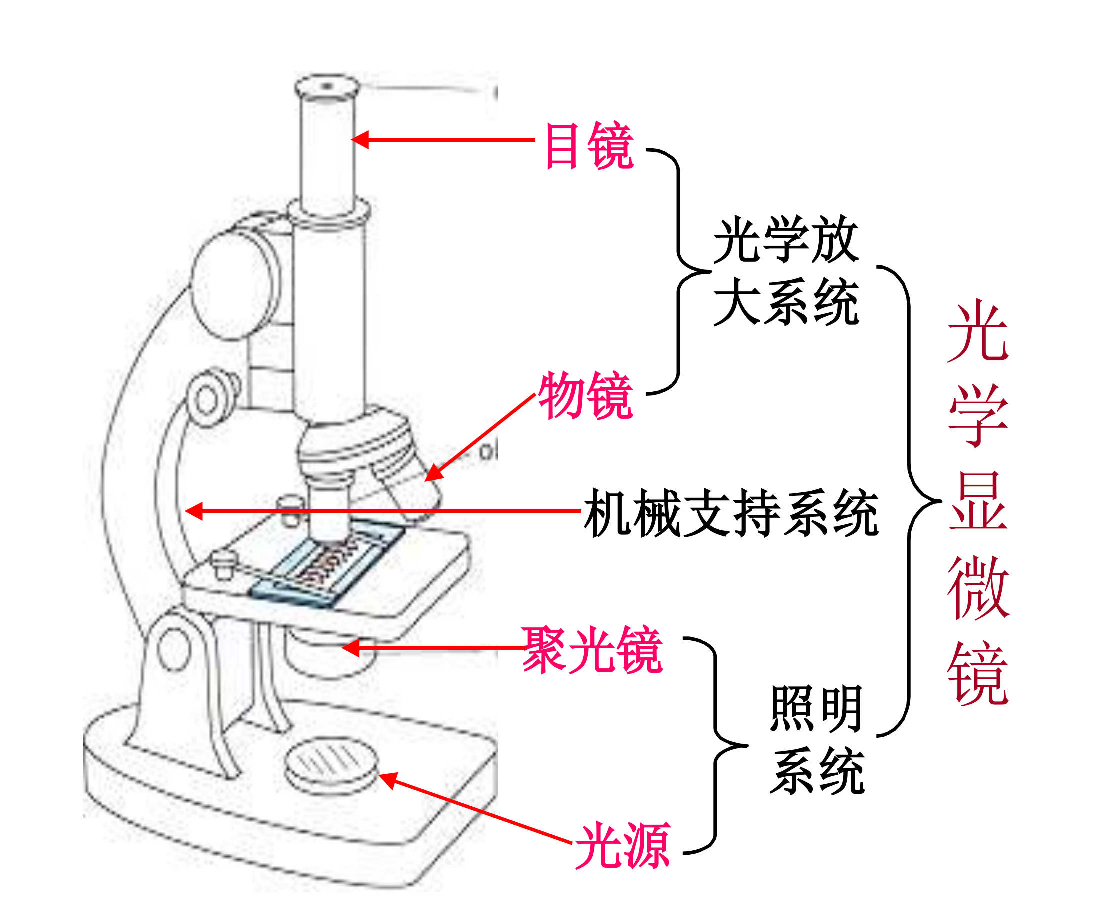
（一)普通复式光学显微镜

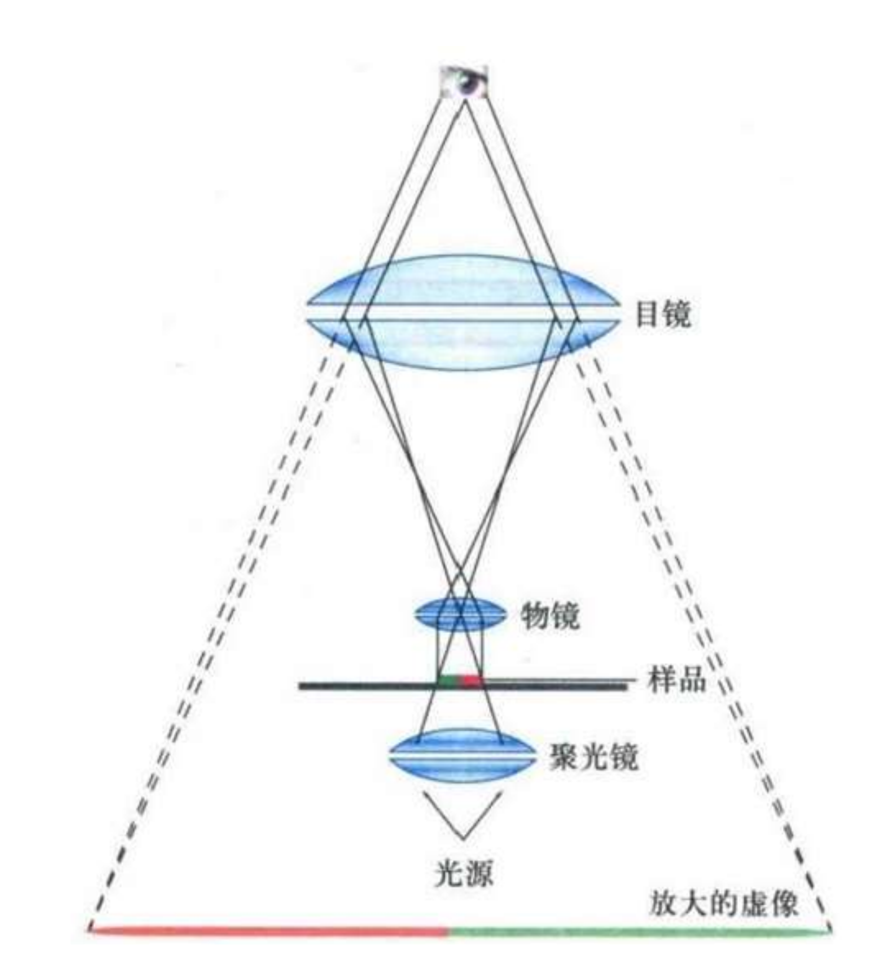
光学显微镜主要由三部分组成：

①光学放大系统：为两组玻璃透镜：目镜与物镜。

②照明系统：包括光源和聚光镜，有时另加各种滤光片以控制光的波长范围。

③镜架及样品调节系统。





显微镜最重要的性能参数是分辨率, 而不是放大倍数。分辨率是指能区分开两个质点间的最小距离。分辨率D 的高低取决于光源的波长λ, 物镜镜口角 a（标本在光轴上的一点对物镜镜口的张角)和介质折射率N,它们之间的关系是:

$$D = \frac{0.61\lambda}{N \cdot \sin(\alpha/2)}$$

通常α最大值可达140°，空气中N=1,

最短的可见光波长λ=400 nm,

此时分辨率D=260nm, 约0.3 μm。

若在油镜下，N 可提高到1.5,

分辨率D则可达 0.2μm,

所以普通光学显微镜的最大分辨率是0.2μm。

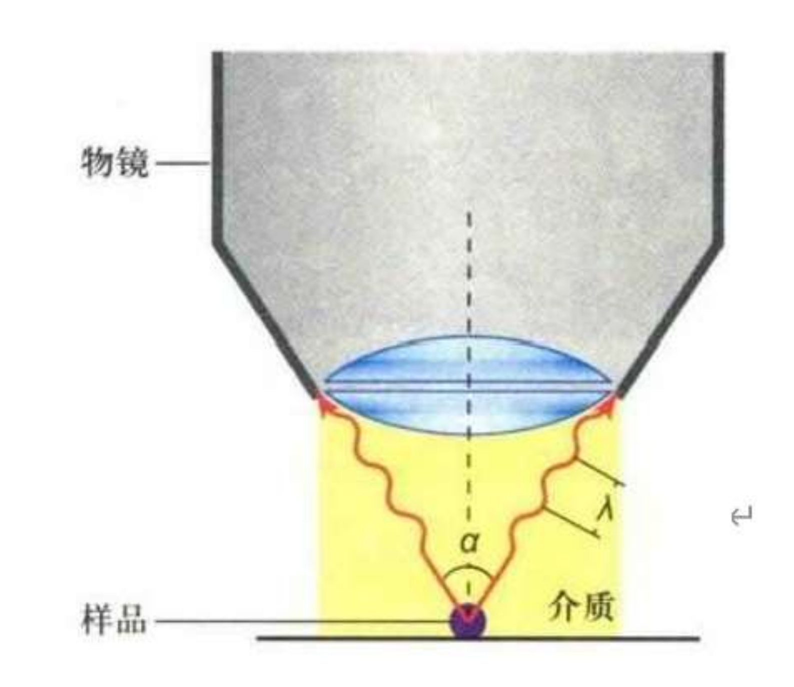
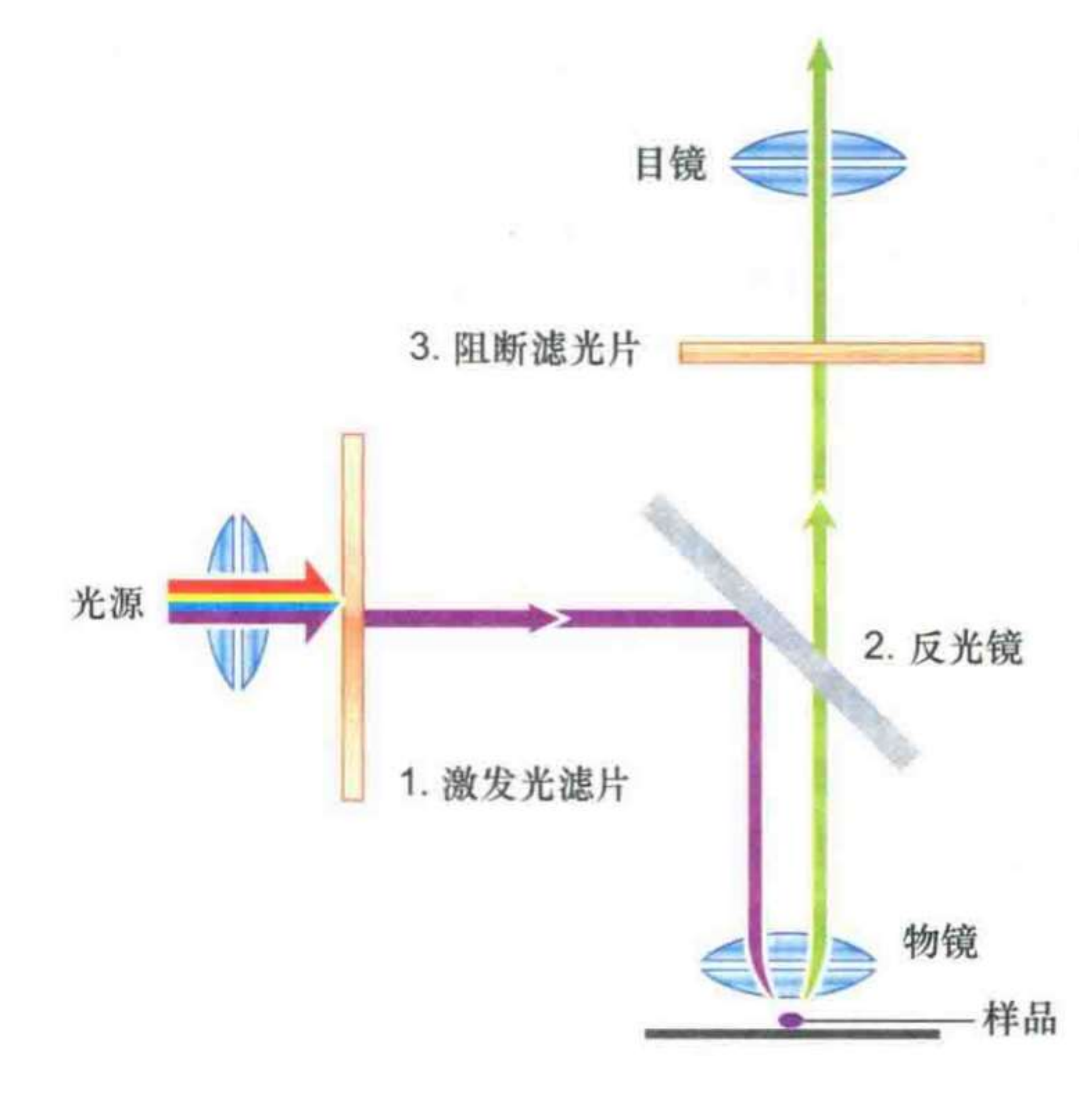


图2-3 决定光学显微镜分辨率的要素：物镜的镜口角(α)、入射光的波长(λ)以及介质的折射率(N)

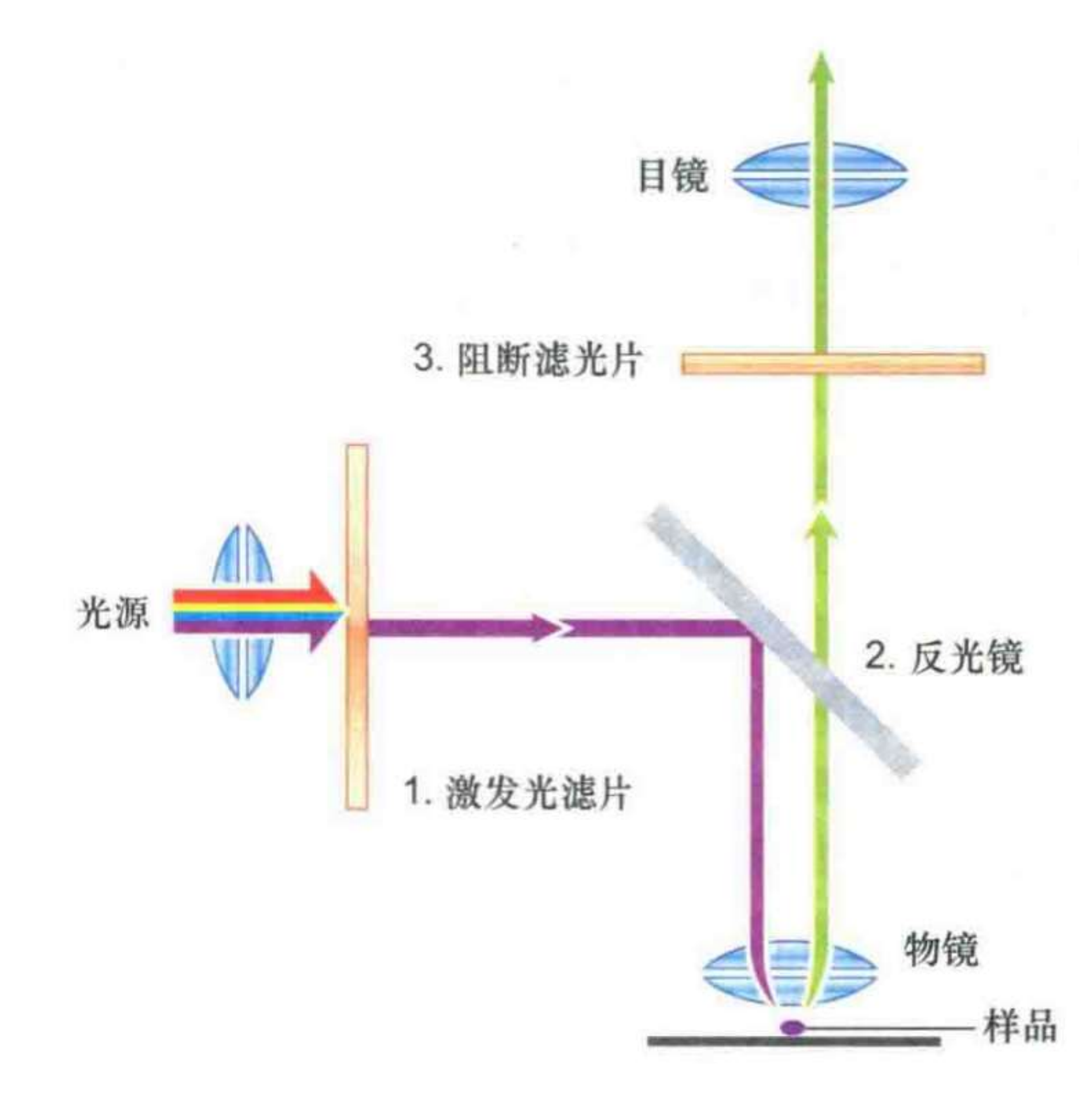
（二）荧光显微镜

- 荧光显微镜是在光镜水平上，对细胞内特异的蛋白质、核酸、糖类、脂质以及某些离子等组分进行定性定位研究的有力工具。
- 荧光显微镜采用的光源和光学系统均与普通光学显微镜有所不同，其核心部件是滤光片系统以及专用的物镜镜头。



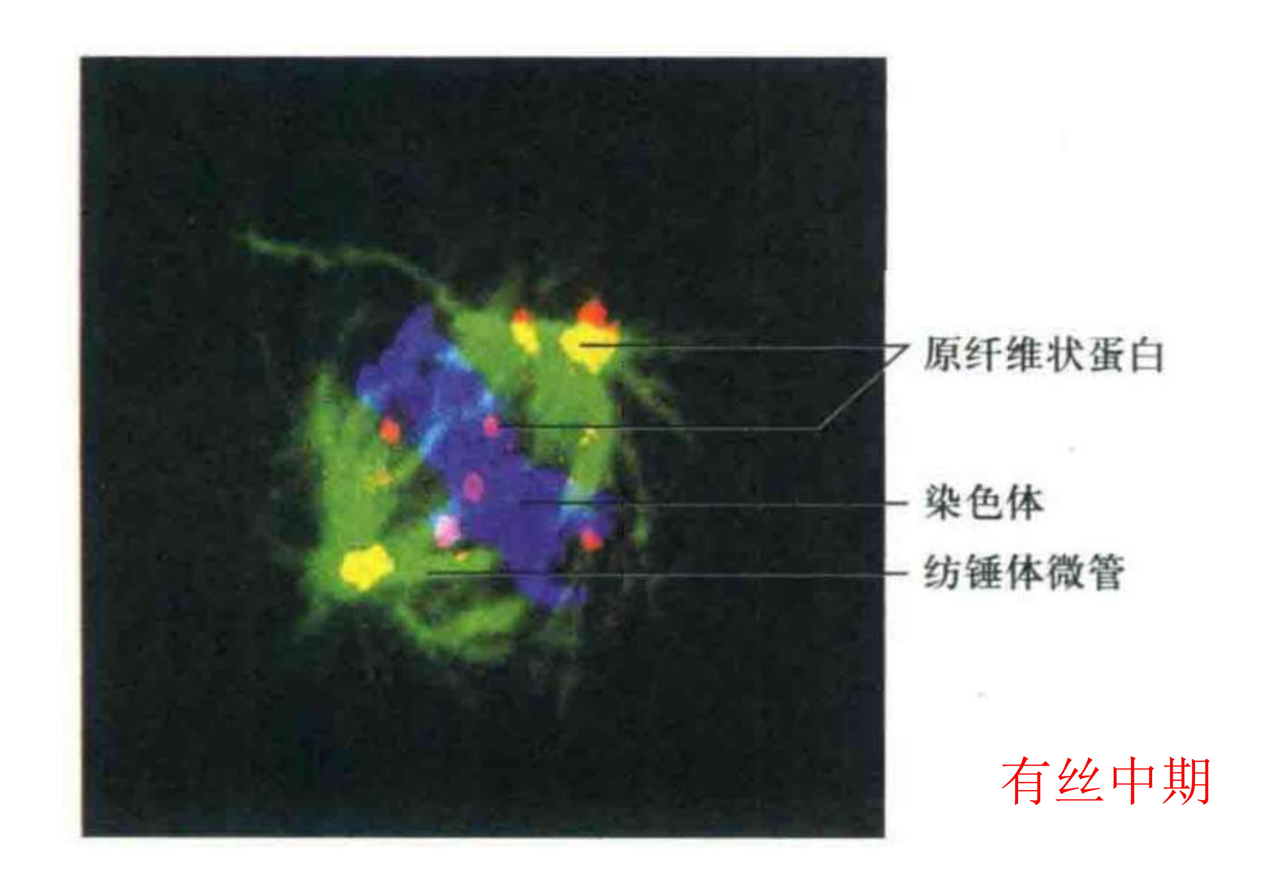
(二）荧光显微镜

- 滤光片系统由激发滤光片(安装在光源和样品之间，只允许特定波长的激发光通过)和阻断滤光片(安装在物镜和目镜之间，只容许荧光染料所发出的荧光通过)组成。这样，通过激发滤光片的短波长的激发光，照射标记在样品中的荧光分子上，使之产生一定波长的可见光即荧光。



(二）荧光显微镜

- 由于荧光显微镜的暗视野为荧光信号提供了强反差背景，非常微弱的荧光信号亦可得以分辨。



（三）电子显微镜

由于光波波长的限制，光镜的分辨率难以得到进一步提高。只有借助分辨率更高的电子显微镜，才可能观察到细胞内部的精细结构。

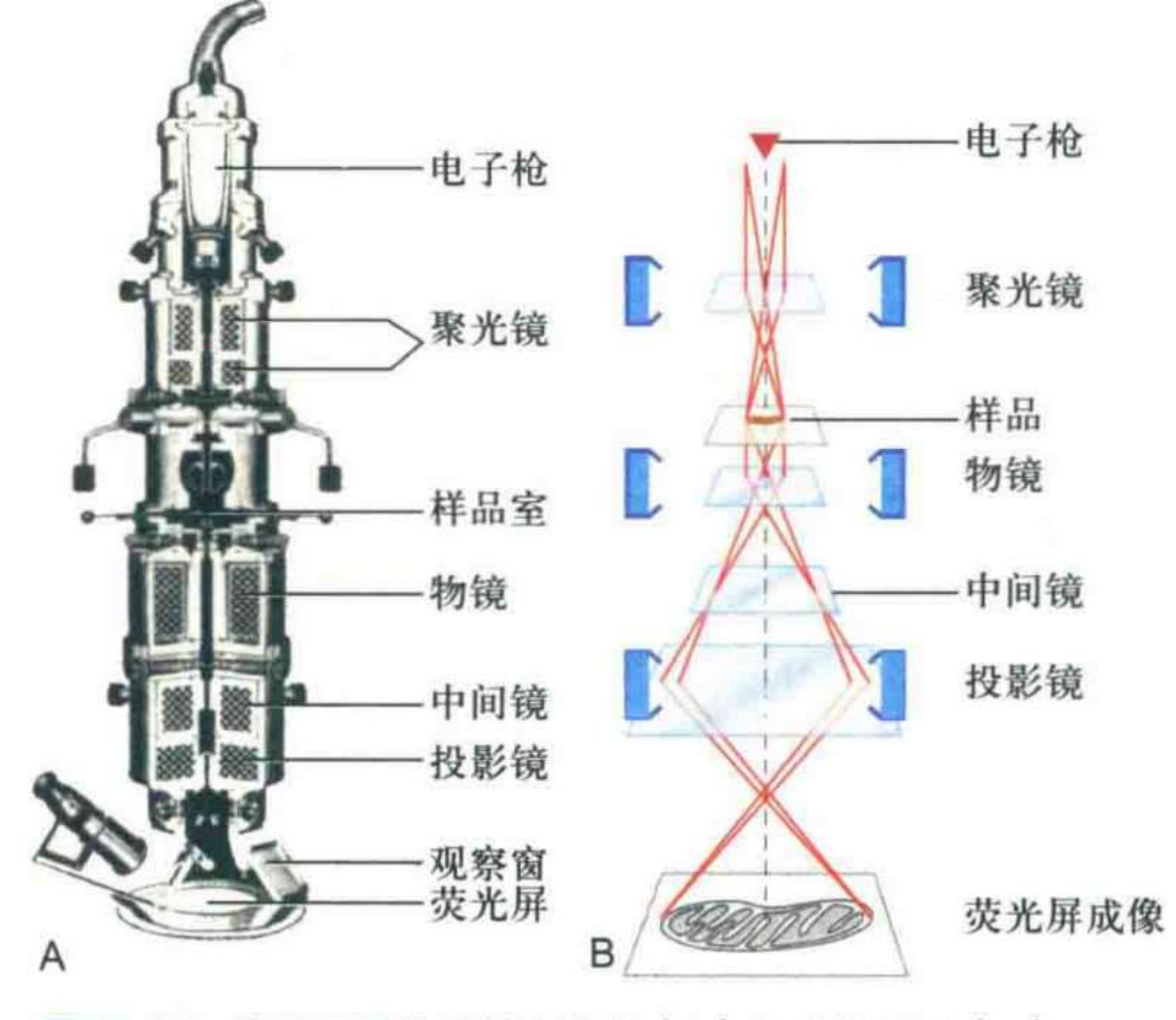


图 2-14 电子显微镜的基本结构（A）和成像原理（B）

(一)电子显微镜的基本知识

1. 电子显微镜与光学显微镜的基本区别

普通光学显微镜以可见光为光源，荧光显微镜的光源是以紫外线为光源，

电子显微镜是以电子束为光源。

表 2-1 电子显微镜与普通光学显微镜的基本区别

	分辨本领	光 源	透 镜	真 空	成像原理
光学显微镜	200 nm	可见光（波长 400～760 nm）	玻璃透镜	不要求真空	利用样本对光的吸收形成明暗反差和颜色变化
电子显微镜	0.2 nm	电子束（波长 0.01～0.9 nm）	电磁透镜	真空	利用样品对电子的散射和透射形成明暗反差

2. 电子显微镜的有效放大倍数与分辨本领

- 如前所述，人眼的分辨率一般为0.2 mm，光学显微镜的分辨率为0.2μm左右，其放大倍数为0.2mm/0.2 μm，即1000倍。
- 而电子显微镜的分辨率可达0.2 nm，其放大倍数为10^6倍。上述放大倍数称之为有效放大倍数。如果通过光学手段继续放大，再也不会得到任何有意义的信息，因此称之为“空放大”。
- 电镜的分辨率与分辨本领并不等同，电镜的分辨本领是指电镜处于最佳状态下的分辨率。实际情况下，电镜的实际分辨率常常受到生物制样技术本身的限制，如在超薄切片样品中其分辨率约为超薄切片厚度的1/10，即通常超薄切片厚度若为50 nm，则实际分辨率约为 5 nm，远低于电镜的分辨本领0.2 nm。

(二)主要电镜制样技术

1. 超薄切片技术

由于电子束的穿透能力有限，为获得较高分辨率，切片厚度一般仅为40～50 nm，即一个直径为20 μ m 的细胞可切成几百片，故称超薄切片。

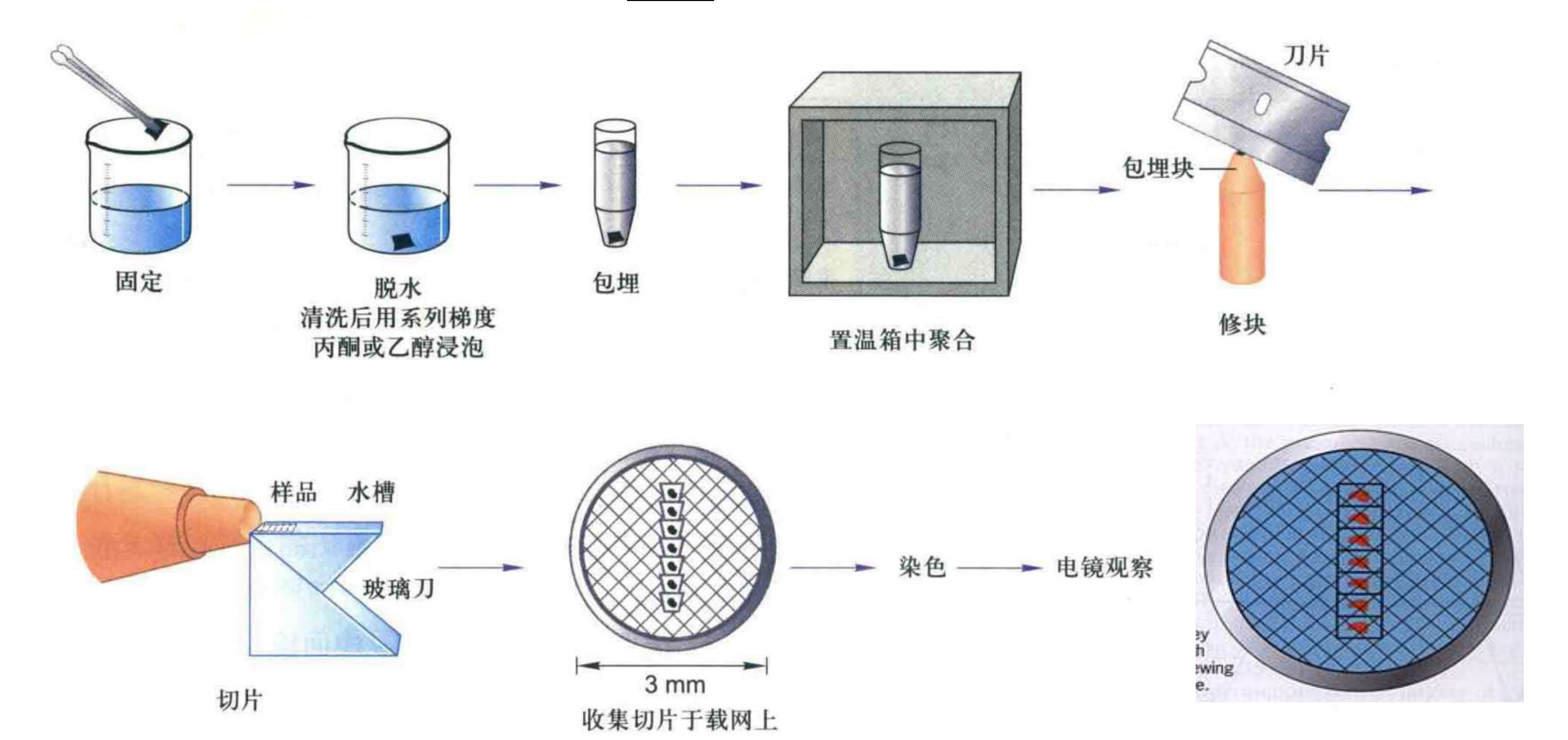
这需要样品既要有一定刚性又要有一定韧性，而生物样品并不具备这些特性，为此，样品往往需要包埋在特殊的介质中。但包埋的过程会破坏样品的细微结构，所以超薄切片样品制备的第一步就是样品的固定，以期更好地保存细胞的精细结构。

五个步骤：固定、脱水、包埋、切片、染色

。

1. 超薄切片技术

方法：常用戊二醛和四氧化锇双重固定 → 丙酮逐渐脱水 → 环氧树脂包埋 → 切片 → 采用柠檬酸铅和醋酸双氧铀等进行染色。



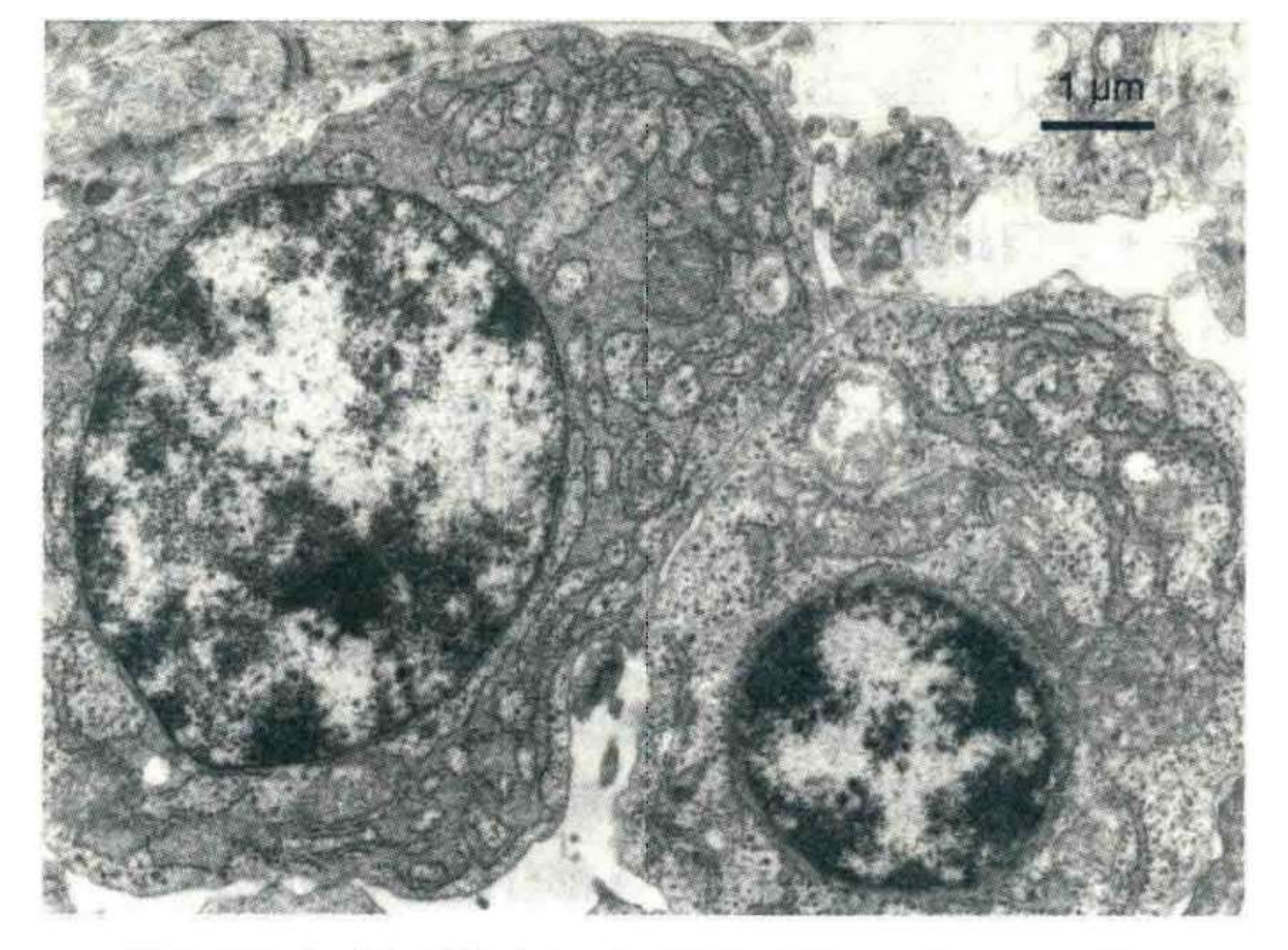
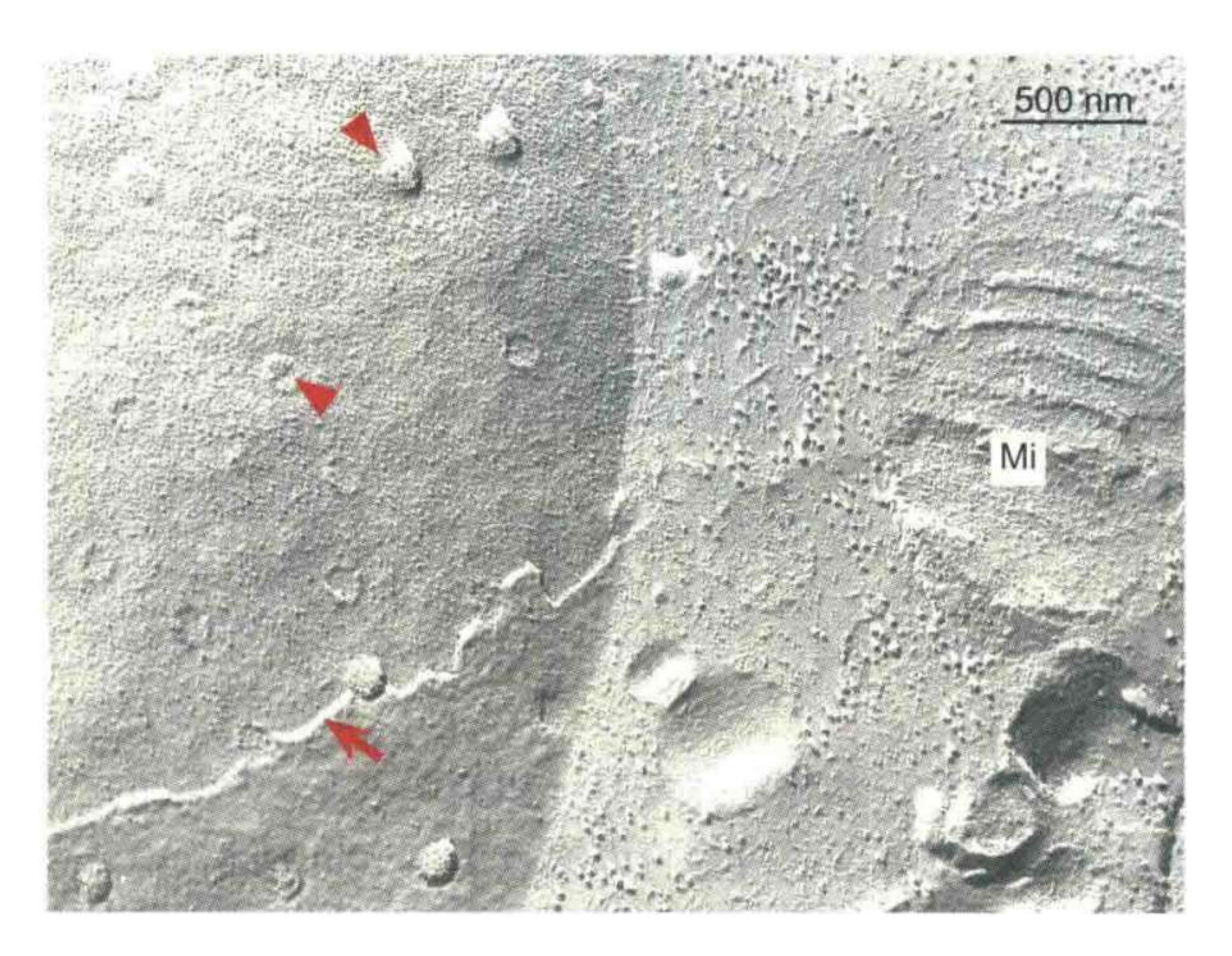


图 2-16　超薄切片技术显示的动物细胞超微结构（洪健惠赠）

2、冷冻/冰冻蚀刻技术：

冰冻蚀刻技术主要用于观察膜断裂面的蛋白质颗粒和膜面结构。

深度蚀刻主要用于观察胞质中的细胞骨架纤维及其结合蛋白。



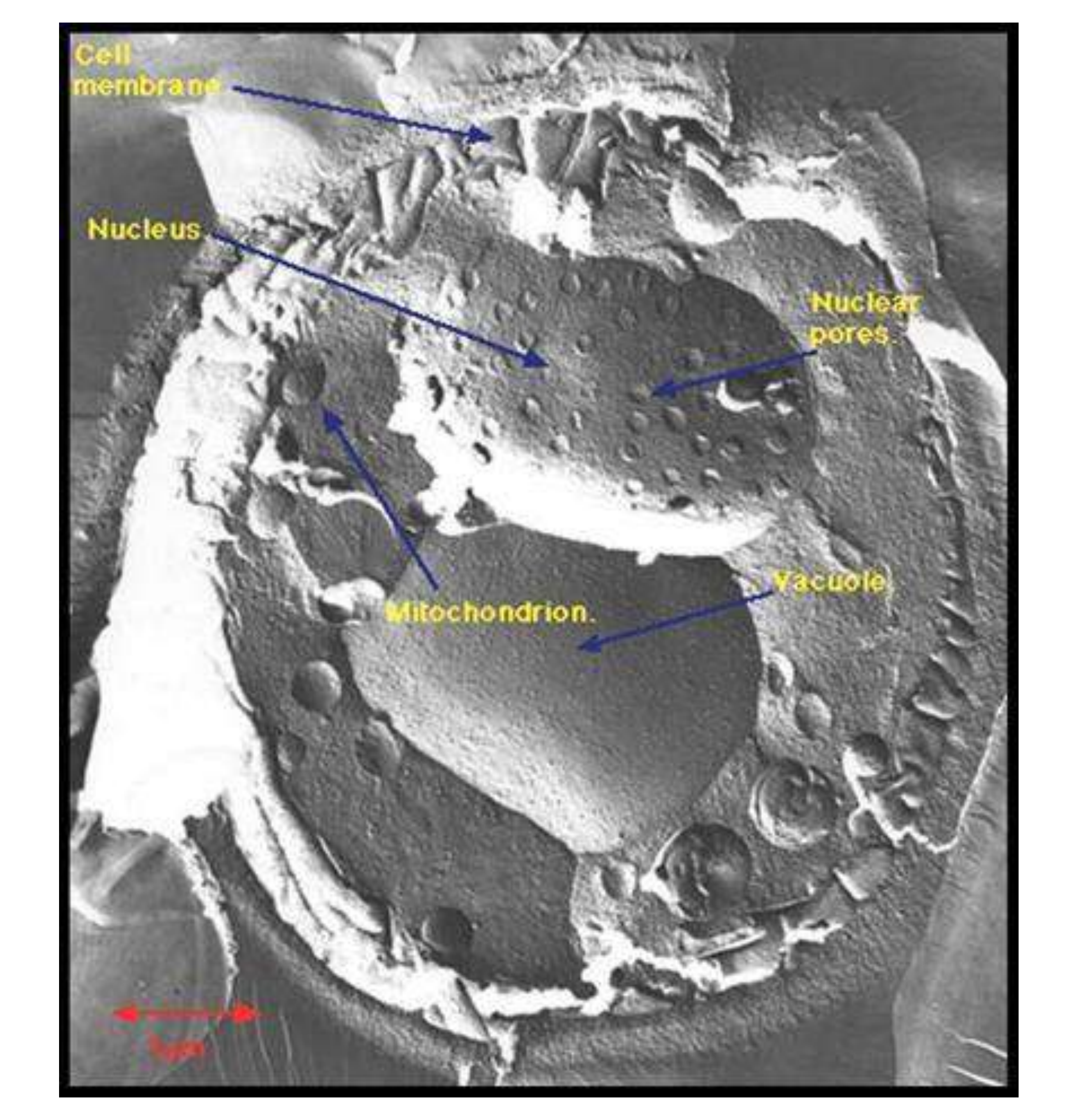
牛肾细胞的冷冻蚀刻电镜图片，

显示双层核膜(箭头所示)、

核孔复合体结构(三角所示)、

线粒体(Mi)、

细胞质中的囊泡等结构。



冰冻蚀刻电镜照片
细胞断裂面结构

3. 扫描电镜技术

通过扫描电镜可以得到样品表面的立体图像信息，成像具有强烈的立体感，一般扫描电镜的分辨本领仅为3nm。

近些年研制的低压高分辨扫描电镜分辨本领可达0.7nm，可用于观察核孔复合体等更精细的结构。



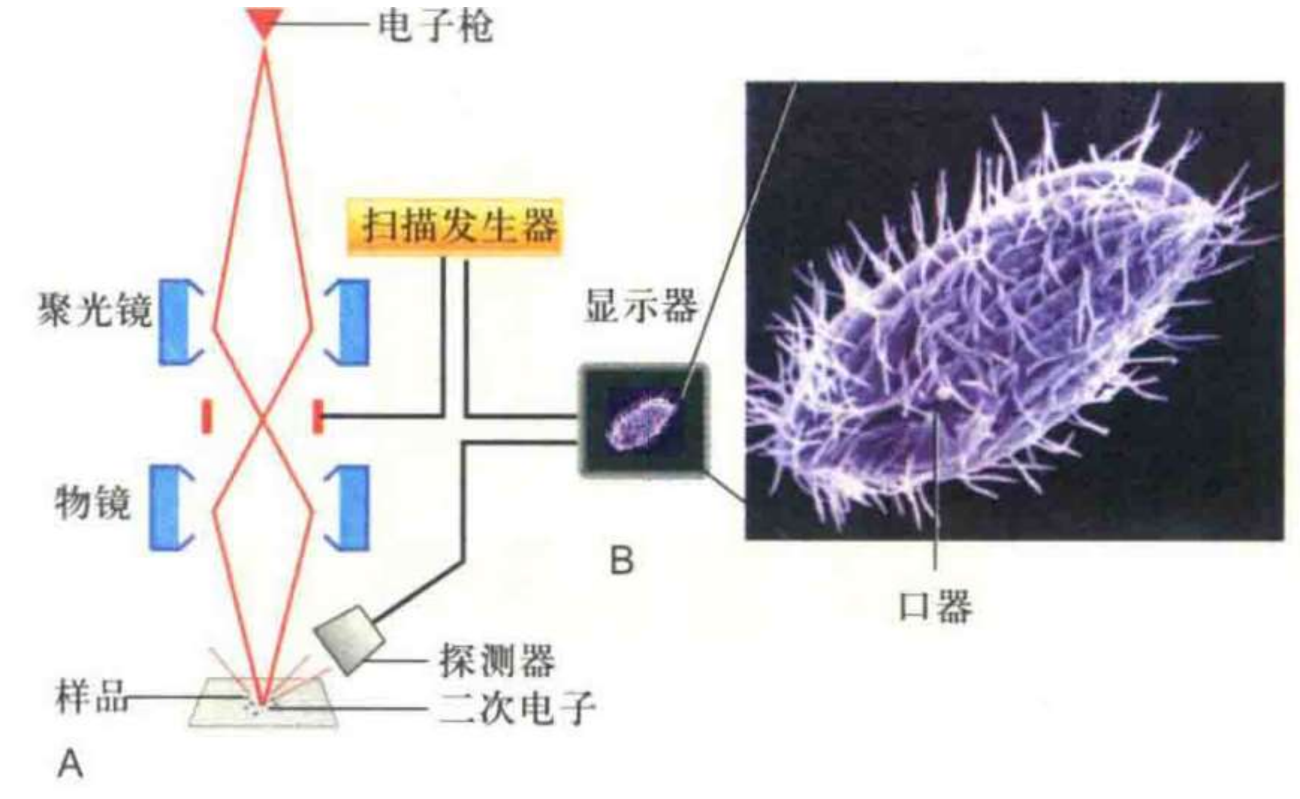
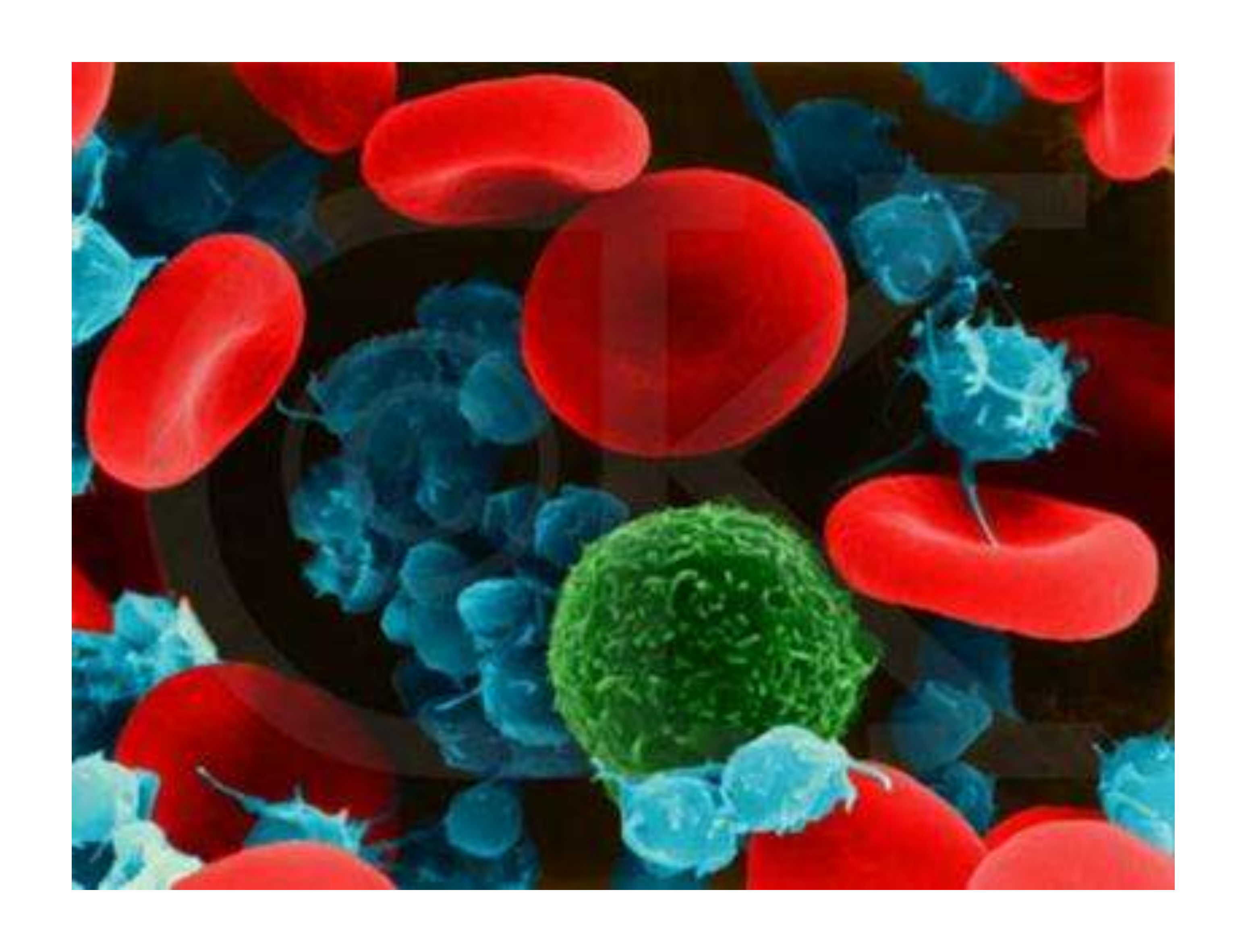
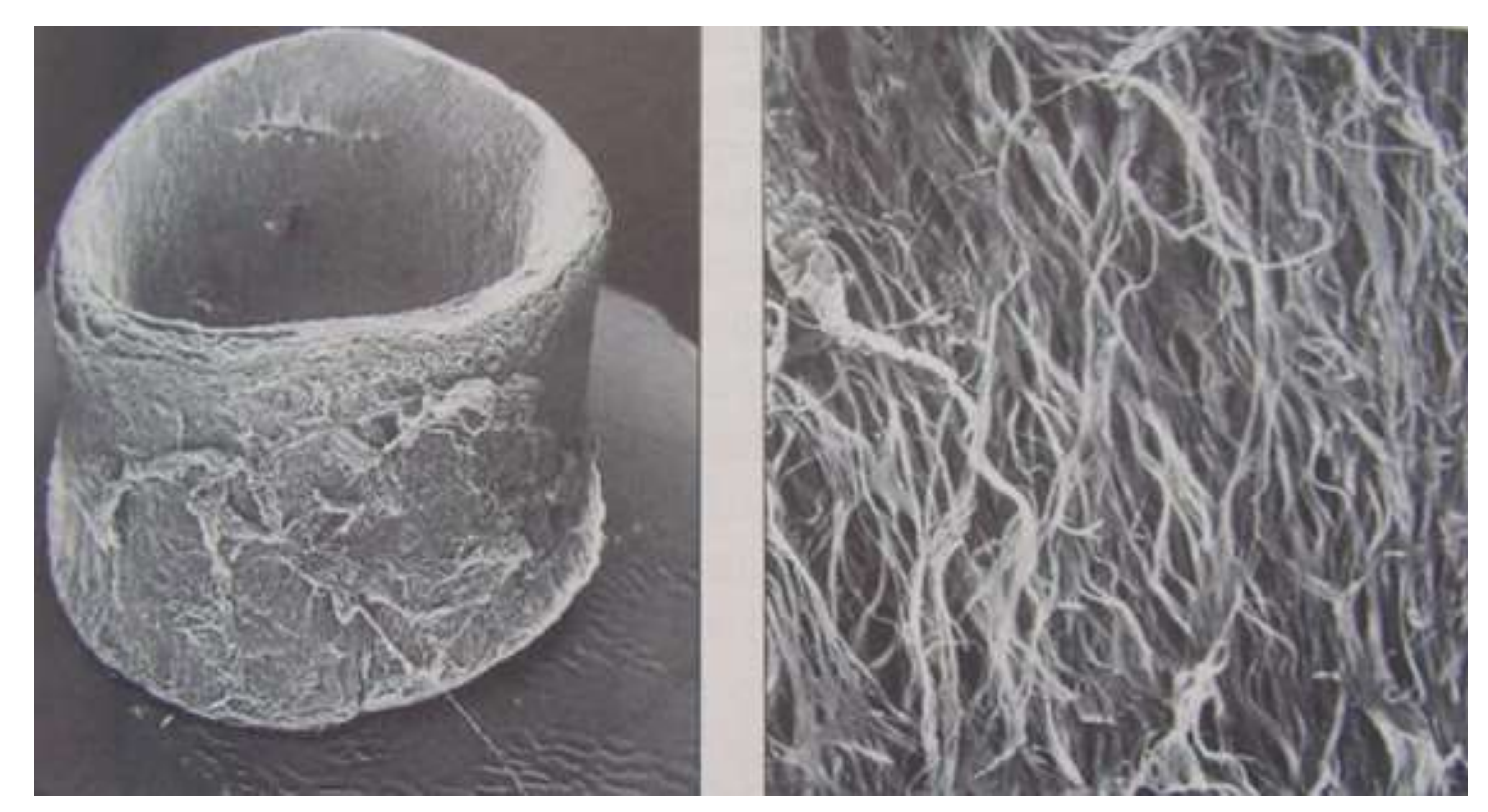


图 2-21 扫描电镜原理示意图（A）及扫描电镜下清晰显示的原生动物四膜虫表面的纤毛和口器（B）（B 图由韩飞和丁明孝提供）



人类血细胞扫描电镜照片



弹性纤维网

左：狗主动脉的低倍扫描电镜图片；

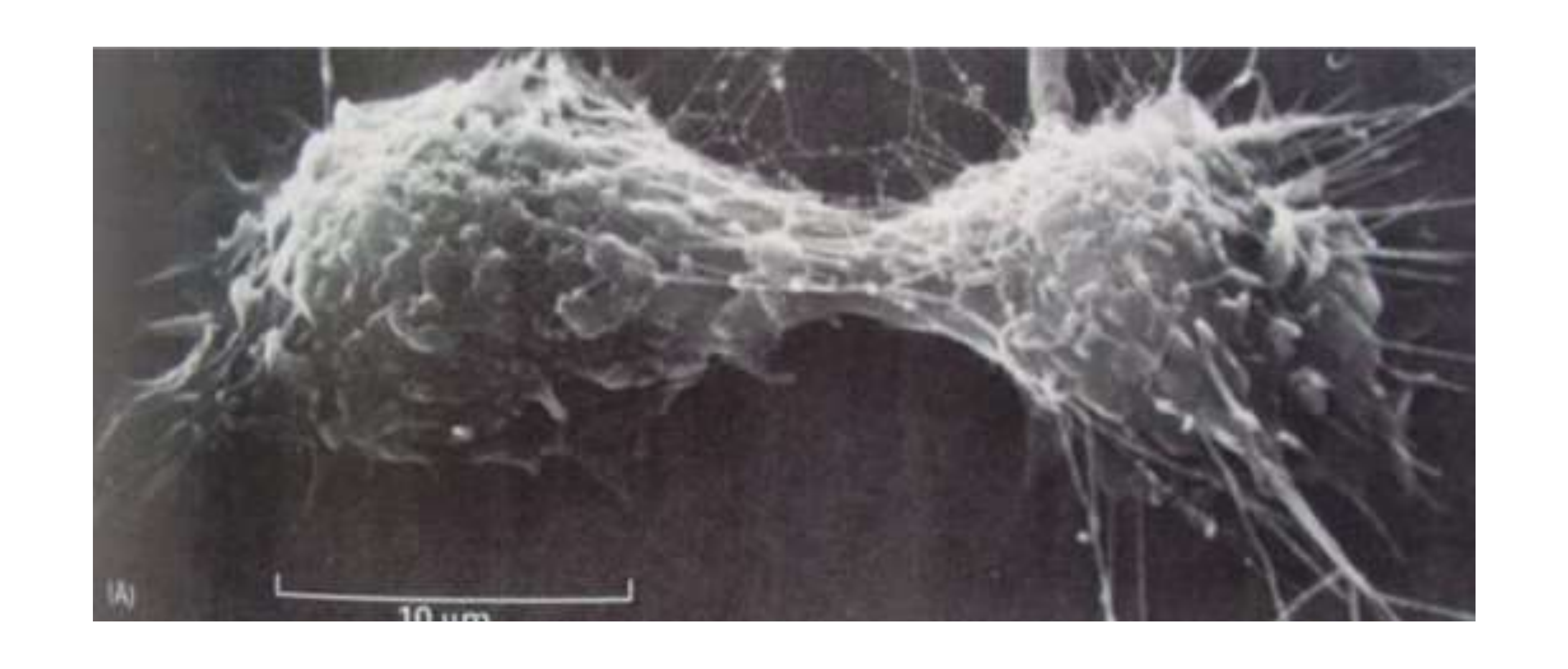
右：同一血管外层的纵向排列的致密弹性纤维网（高放大倍数）。

其它成分已用酶和甲酸消化。

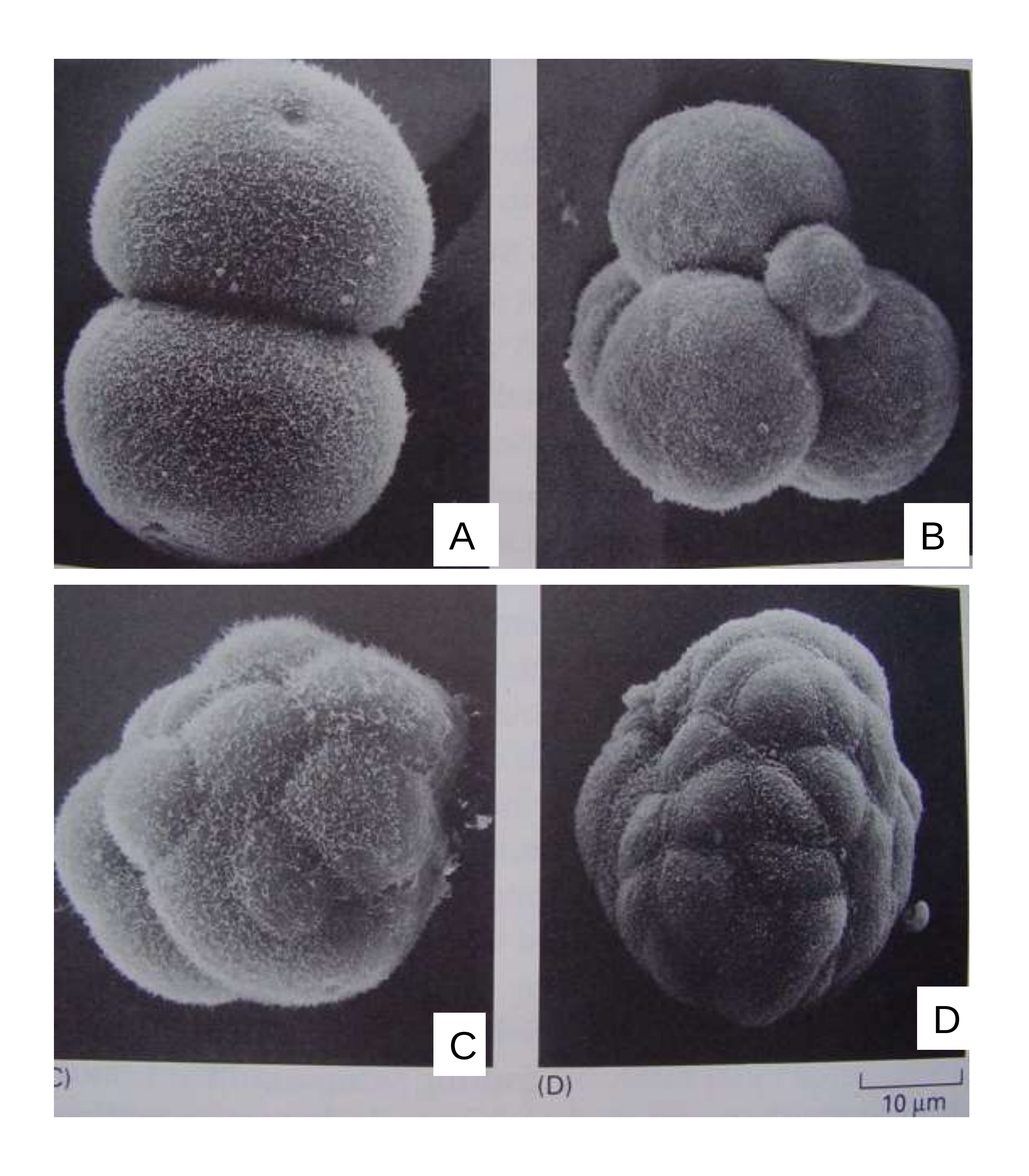


一个典型的有丝分裂中期的染色体近末端区域的扫描电镜照片

一个有丝分裂染色体的染色单体的透射电镜照片



一个正在分裂的动物培养细胞，扫描电镜图片



早期小鼠胚胎的扫描电镜照片

A：2细胞时期

B：4细胞时期

C：8-16细胞时期，桑椹胚

D：胚泡期

二、细胞组分的分析方法：

（一）用超离心技术分离细胞组分

常用方法有：差速离心法、密度梯度离心法。

差速离心：利用不同离心速度所产生的不同离心力，将亚细胞组分和各种颗粒进行分开的方法。

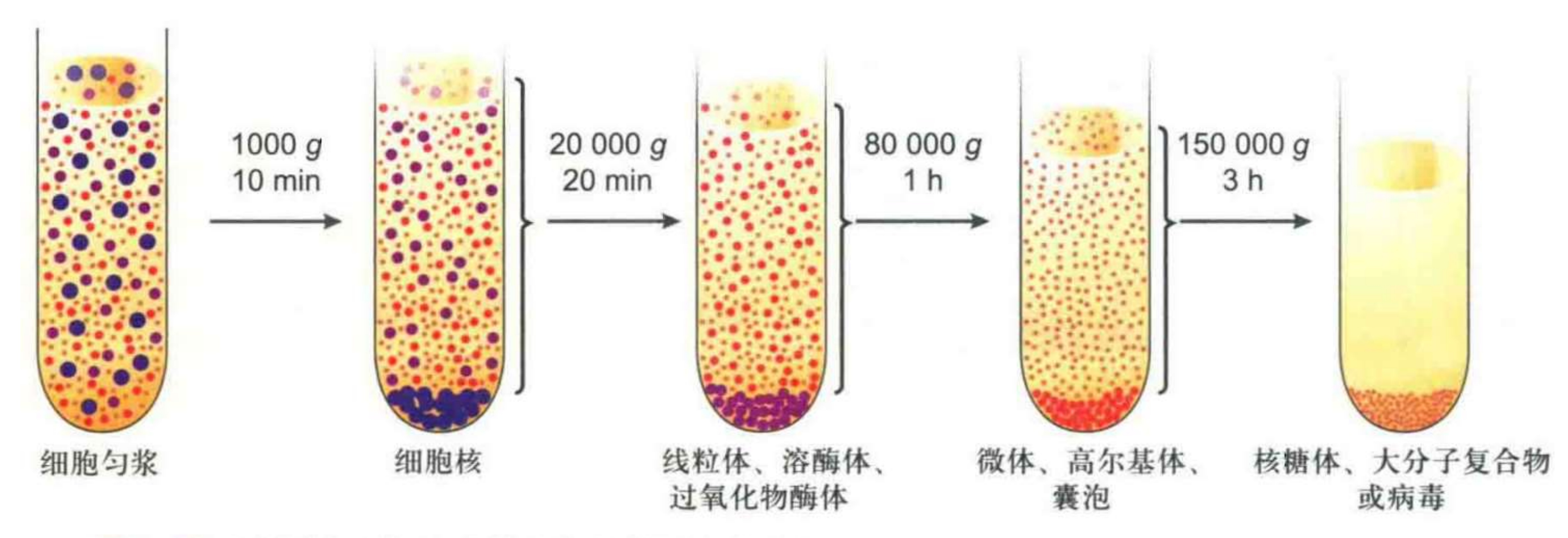


图 2-22　用差速离心法分离细胞匀浆中的各种细胞组分

图中显示，随着离心力（g）大小和离心时间的不同，各种细胞组分沉淀在不同的离心管底部。

密度梯度离心：利用各组分在介质中的沉降系数不同，使各组分形成区带

。

➢介质溶液：具有密度梯度、高溶解性和化学惰性的溶液。

➢分为速度沉降和等密度沉降两种，前者主要用于分离密度相近而大小不一的组分，后者用于分离不同密度的细胞成分

速度沉降：离心前，将要分离的细胞匀浆物放置在蔗糖浓度梯度(通常质量分数范围为5%—40%)溶液的上层，各种细胞组分根据它们的大小以不同的速度沉降，形成不同的沉降带，然后分别收集不同的沉降带 中的组分，用于分析。

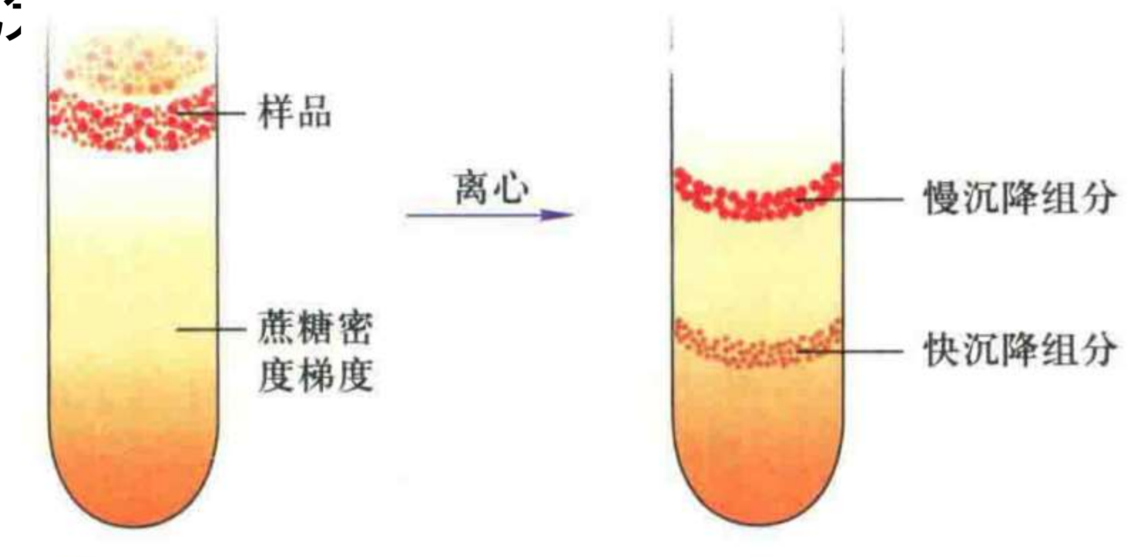
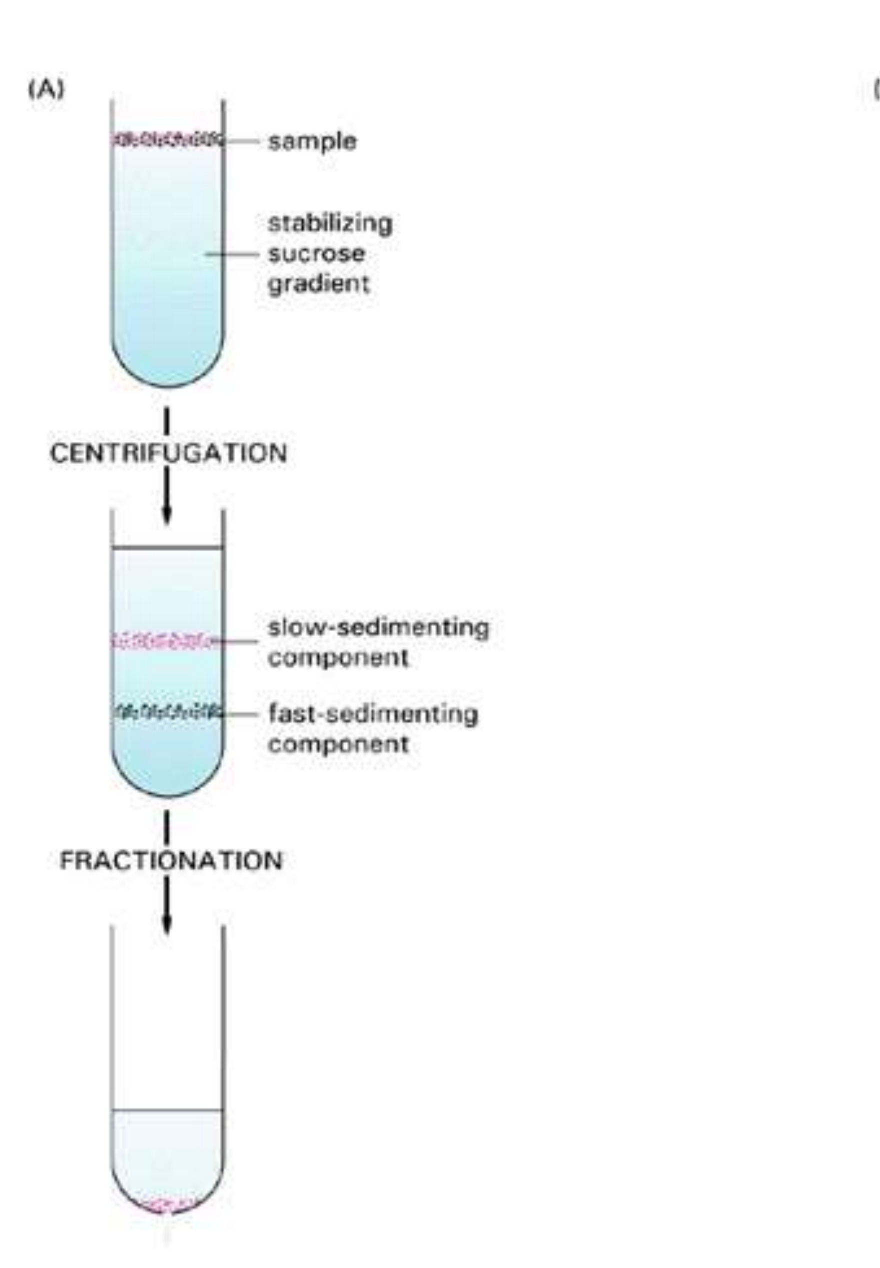


图 2-23 用密度梯度离心分离细胞组分示意图

等密度沉降用于分离不同密度的细胞组分。细胞组分在连续梯度的高密度介质（如**氯化铯**）中经离心力场长时间的作用**沉降或漂浮到与自身密度相等的位置**，形成不同的密度区带。

这种方法**非常灵敏**，甚至可以将掺入重同位素如 ^{14}C 或 ^{15}N 的生物大分子和未标记物分开。



（二）细胞内物质显示方法：

原理：利用一些显色剂与所检测的物质中一些特殊基团特异性结合或反应的特征，通过显色剂在细胞内的定位和颜色深浅来判断某种物质在细胞中分布和含量。

DNA：福尔根（Feulgen）反应
希夫试剂（schiff）——紫红色

多糖类：PAS反应——黄色

脂肪：四氧化锇——黑色
苏丹III——红色

蛋白质：米伦（Millon）——红色

（三）细胞内特异核苷酸序列的定位与定性

原位杂交技术（定义或原理）：

➢用带有标记的特定核酸分子作探针，通过分子杂交（碱基互补配对原理）确定特殊核苷酸序列在染色体上或在细胞中的位置的方法。

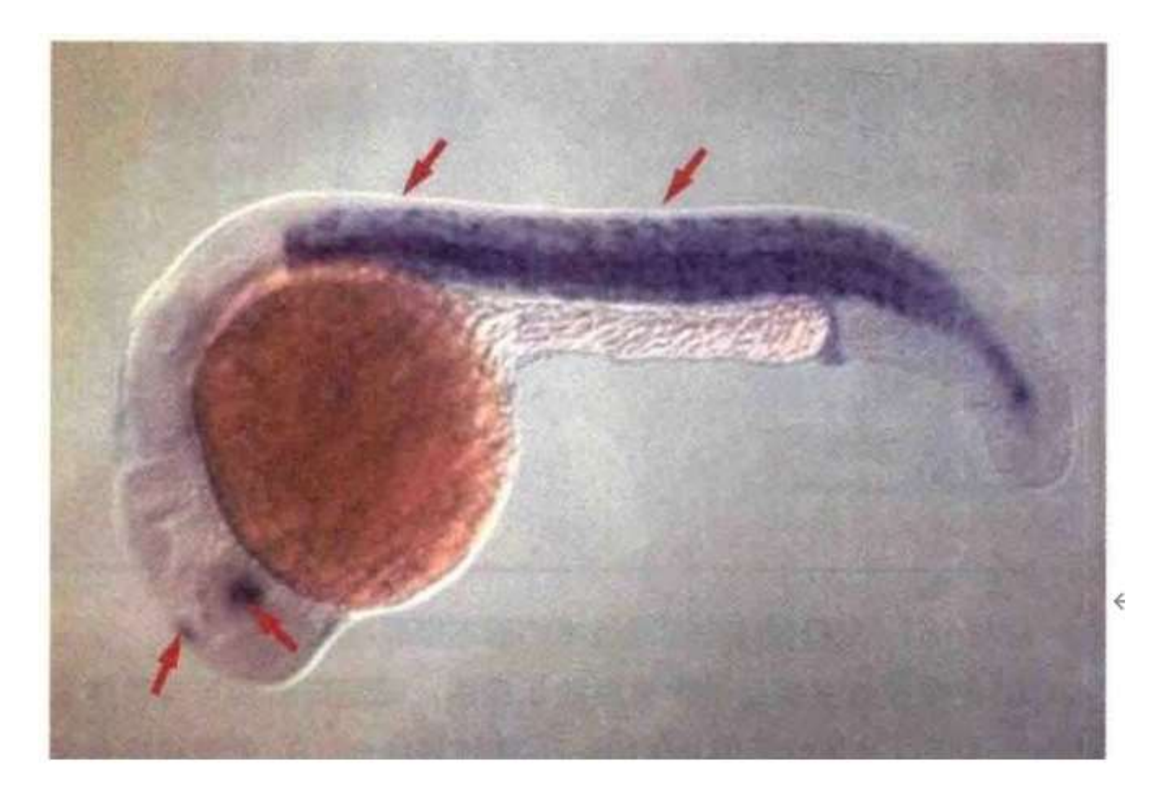


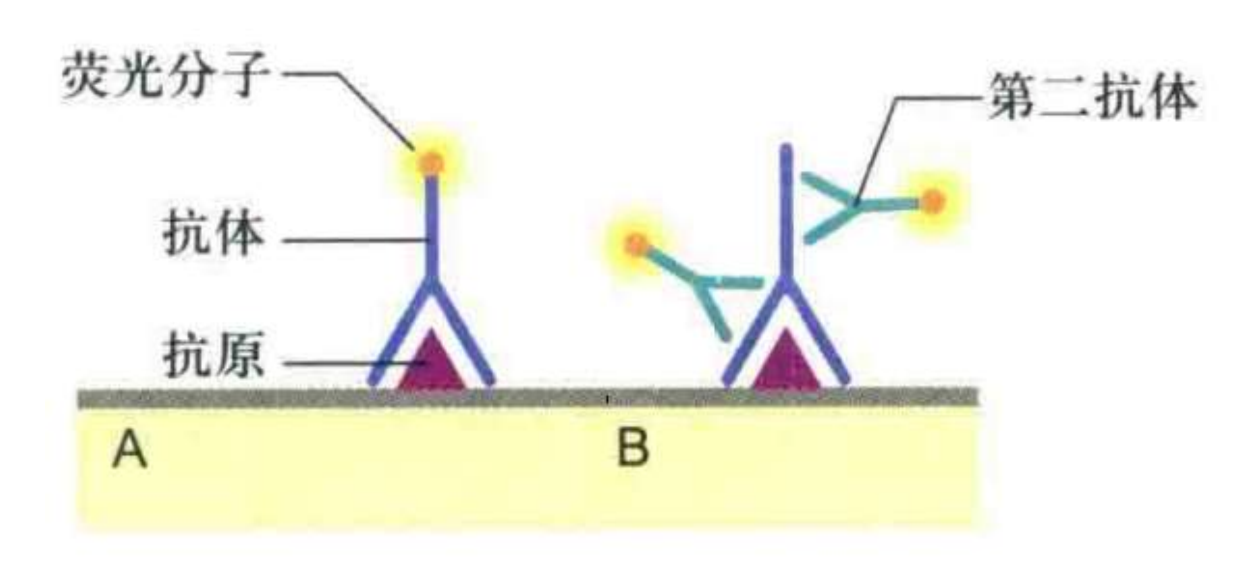
图2-26　用原位杂交技术显示Z13 基因在受精后1天的斑马鱼胚胎的体节、眼和松果体中的表达(箭头所指)。(张博博士惠赠)

（四）特异性蛋白或抗原的定位与定性：

蛋白质分子定位最常用的研究技术：免疫荧光与免疫电镜技术。

免疫荧光技术：

将免疫学方法（抗原-抗体特异结合）与荧光标记技术（使抗体带荧光）相结合用于研究特异蛋白抗原在细胞内分布的方法， 它包括直接和间接免疫荧光技术两种。



-24 直接免疫荧光标记与间接免疫荧光标记技术

A.直接免疫荧光标记技术：将荧光分子与抗体偶联后直接用于免疫标记技术。

B.间接免疫标记技术：先将抗体(称第一抗体)与抗原反应，然后加入与荧光分子相偶联的抗第一抗体的抗体(称第二抗体)。

（四）特异性蛋白或抗原的定位与定性：

蛋白质分子定位最常用的研究技术：免疫荧光与免疫电镜技术。

免疫电镜技术：

免疫电镜技术是免疫化学技术与电镜技术结合的产物，是在超微结构水平研究和观察抗原、抗体结合定位的一种方法学。它是将抗体进行特殊标记后用电子显微镜观察免疫反应的结果。

根据标记方法的不同， 分为免疫铁蛋白技术、免疫酶标技术和免疫胶体金技术。

（四）放射自显影技术：

概念：

放射自显影技术是利用放射性同位素的电离射线对乳胶(含AgBr 或 AgCl）的感光作用，对细胞内生物大分子进行定性、定位与半定量研究的一种细胞化学技术。对细胞或生物体内生物大分子 进行动态研究和追踪是这一技术独具的 特征。主要包含前体物掺入和放射显影两个步骤。

研究DNA、RNA、蛋白质在细胞中的代谢，常用的同位素标记物有：

DNA: ^{3}H标记的胸腺嘧啶脱氧核苷

RNA： ^{3}H标记的尿嘧啶核苷

Protein: ^{35}S标记的甲硫氨酸和半胱氨酸，^{3}H或^{14}C标记的甲硫氨酸或亮氨酸

三、细胞培养、细胞工程与显微操作技术：

- **原代培养：** 从机体取出后立即培养的细胞。一般传代不超过10代。
- **传代培养：** 适应在体外培养条件下持续培养的细胞。

动物细胞培养的条件

充足的营养、稳定的内环境

糖类、氨基酸、无机盐、维生素 …

营养条件 < 动物细胞培养所需基本条件 > 其他条件

- 无菌、无毒的环境
- 适宜的温度、pH和渗透压
- 适宜的气体环境

培养基的构成：合成培养基 + 血清等天然成分

合成培养基：将细胞所需的营养物质按种类和所需量严格配制而成的培养基

血清等天然成分：含人类未知、细胞生长增殖所必需的物质，满足细胞对未知营养成分的需求。



一般用液体培养基，也称为培养液

动物细胞培养的条件

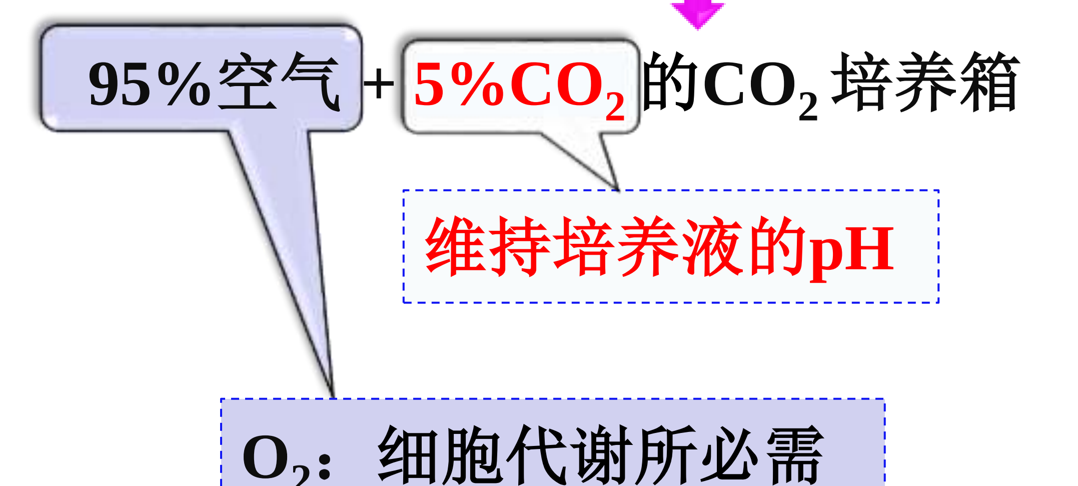
糖类、氨基酸、无机盐、维生素 …

营养条件 < 动物细胞培养所需基本条件 > 其他条件



- ★无菌、无毒的环境
- ★适宜的温度、pH和渗透压
- ★适宜的气体环境





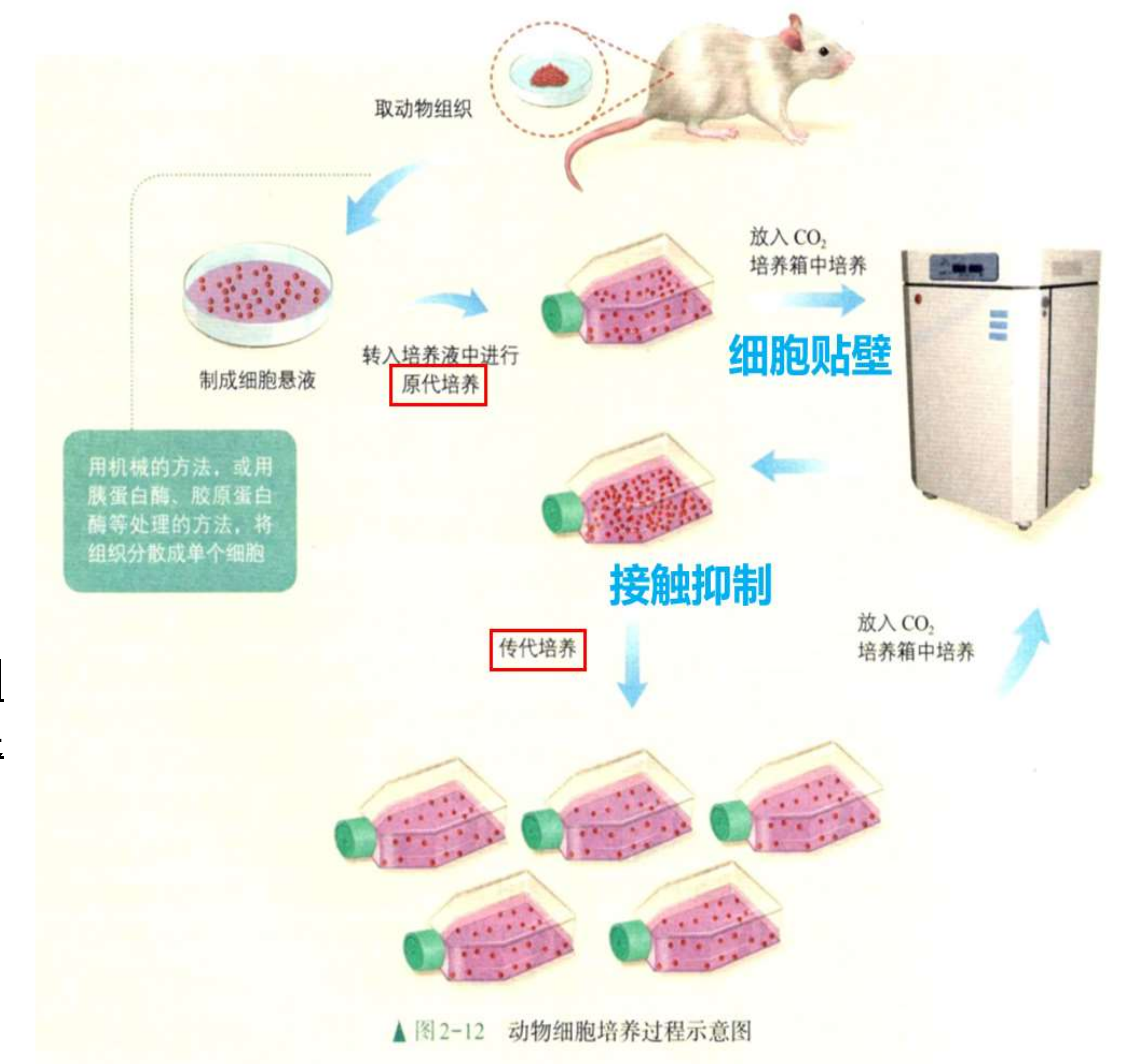
动物细胞培养的过程

细胞贴壁

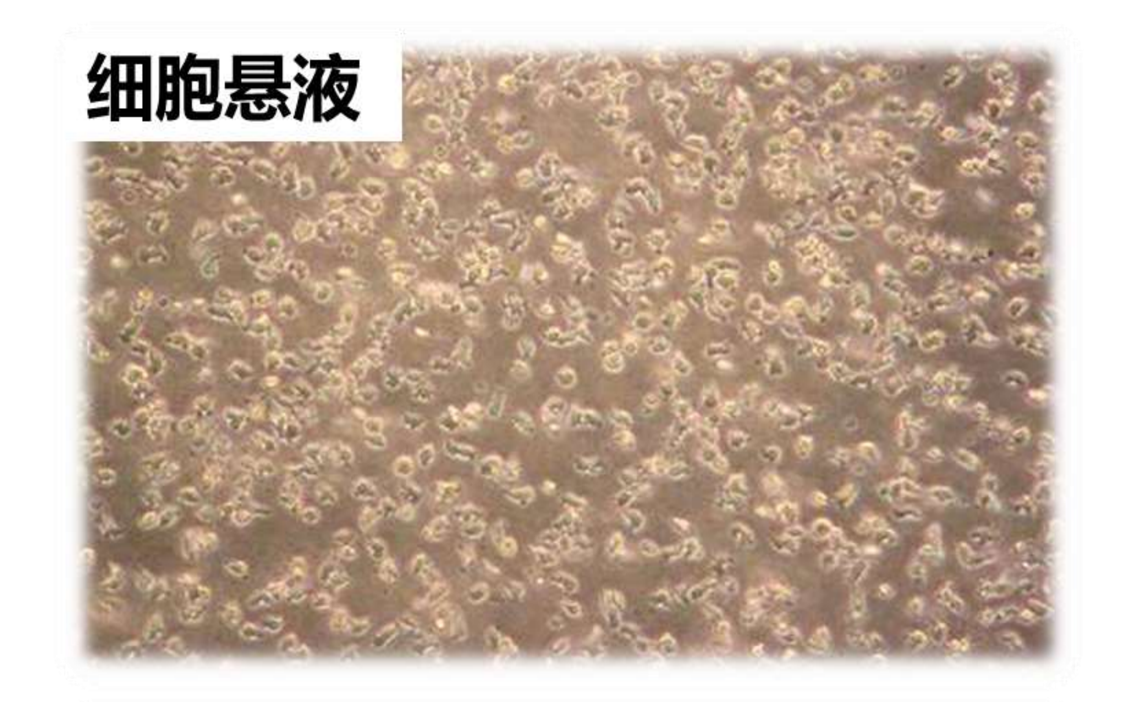
悬液中分散的细胞**贴附**在瓶壁生长的现象

接触抑制

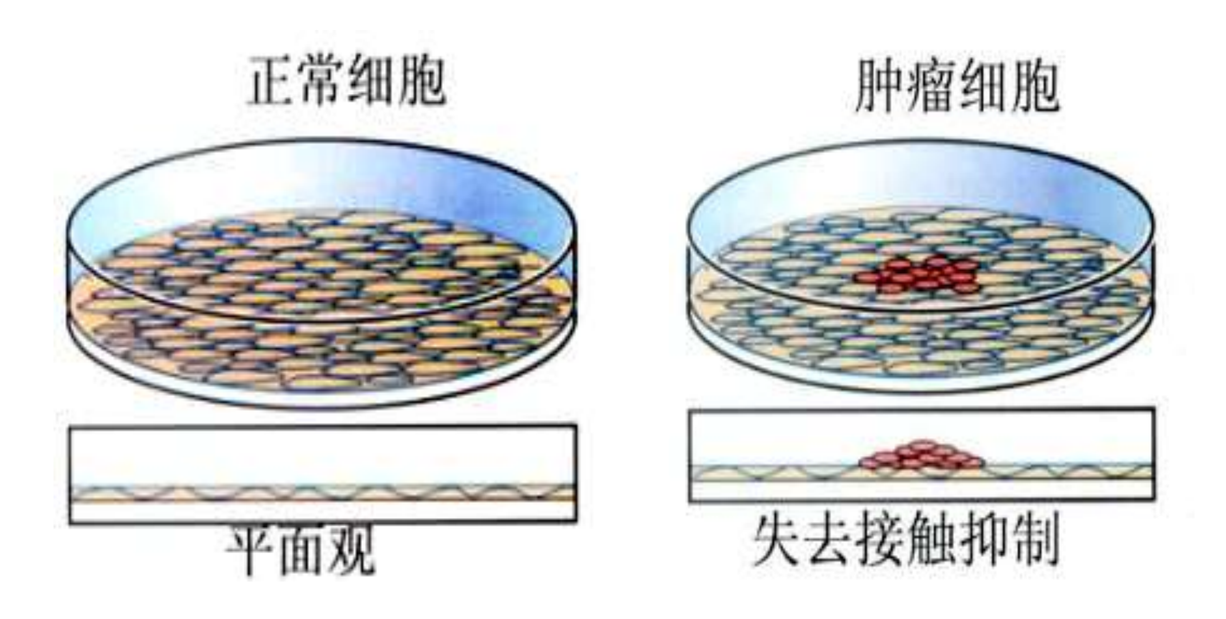
当贴壁细胞分裂生长到表面相互接触时，细胞就会停止分裂增殖的现象



▲图 2-12 动物细胞培养过程示意图


细胞悬液


细胞贴壁、接触抑制


正常细胞
肿瘤细胞
平面观
失去接触抑制

三、细胞培养、细胞工程与显微操作技术：

- 原代培养：从机体取出后立即培养的细胞。一般传代不超过10代。
- 传代培养：适应在体外培养条件下持续培养的细胞。
- 细胞系：经第一代传代成功后，可顺利地传40-50代，且保持原来的染色体的二倍体数量和接触抑制行为的传代细胞。
- 细胞株：通过选择法或克隆形成法从原代培养物或细胞系中获得具有特殊性质或标志物的培养物，亦即由单细胞增殖形成的细胞群，称为细胞株。是具有相同的遗传性状的细胞群体。

（二）植物细胞培养

目前植物细胞培养主要有两种类型：

(1)细胞培养： 常用单倍体细胞培养，这种培养方法主要用花药在人工培养基上进行培养。可以从小孢子(雄性生殖细胞)直接发育成胚状体，然后长成单倍体植株。单倍体细胞培养在植物育种中已取得了很大成就。

(2)原生质体培养：一般用植物的体细胞(二倍体细胞)，先经纤维素酶处理去掉细胞壁，去壁的细胞称为原生质体。原生质体在无菌培养基中可以生长与分裂，经过诱导分化最终可长成植株。

也可以用不同植物的原生质体进行融合与体细胞杂交，由此而获得体细胞杂交的植株。

(二)植物细胞培养

目前在植物无性繁殖中常采用植物组织培养，即分离出小块的植物体，又称外殖体，在体外无菌条件下进行培养，形成愈伤组织，即植物创面的新生组织。在一定条件下，诱导分化最终长成植株。

（三）细胞工程：

应用细胞生物学和分子生物学原理和方法，通过某种工程学手段，在细胞整体水平或细胞器水平上，依照人们的需要和设计来改变细胞内遗传物质或获得细胞产品的一门综合科学技术。

细胞融合：

在自然条件下或通过人工诱导的方法使两个或多个细胞融合成一个双核或多核细胞的现象。

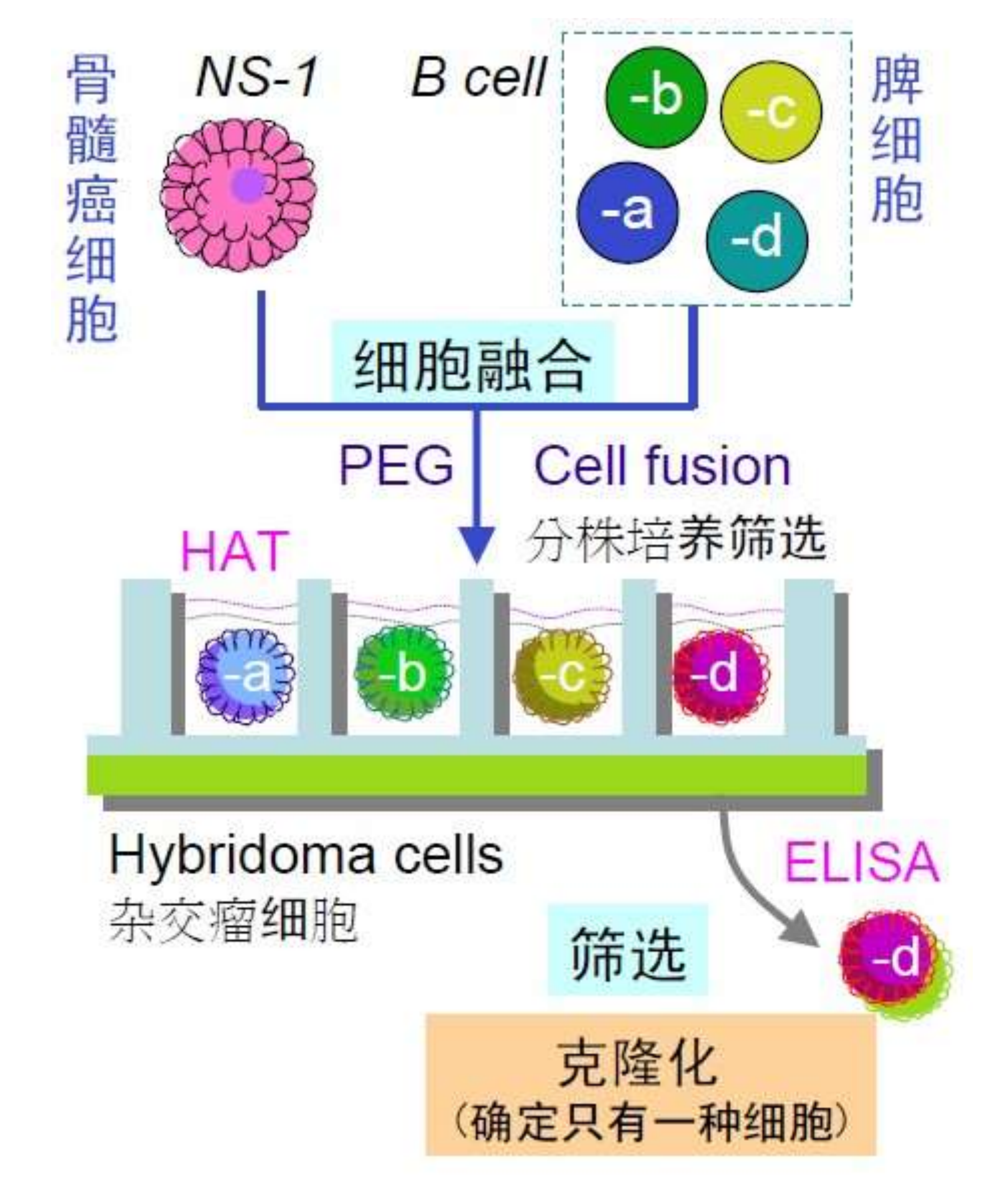
人工诱导细胞融合方法：化学诱导：PEG；病毒诱导：仙台病毒；电融合技术

细胞拆合：

就是把细胞核与细胞质分离开来，然后把不同来源的细胞质和细胞核相互结合，形成核质杂交细胞的过程。

单克隆抗体技术：

将一种来自于脾脏且产生抗体的B淋巴细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合杂交，获得既能产生抗体，又能无限增殖的杂种细胞，经选择性培养后可制备大量单克隆抗体的技术。



（三）细胞工程：

基因打靶：

又称为基因敲除，是指从分子水平上将一个基因去除或替代，然后从整体观察实验动物，推测相应基因功能的实验方法。

转基因动物：

指以人工方法导入外源基因，在染色体内稳定整合并能遗传给后代的一类动物。转基因动物是在胚胎和重组DNA技术发展的基础上产生的。能在生物体中接近真实地再现某一特定基因的表达和所导致的后果，把复杂系统简化进行研究，是目前层次最高的实验体系。

四、模式生物：

由于基因在进化上的保守性和遗传密码的通用性，从某一种生物得到的有关基因性质或功能方面的信息往往也适用于其他生物。因此，可利用一些个体较小、容易培养、操作简单、生长繁殖快的生物来研究某一生物学问题，这类生物称为模式生物。

共同点：个体小；易培养；操作简单；生长繁殖快。

1.病毒



冠状病毒

- 结构简单，基因组小，繁殖快，适于遗传操作。

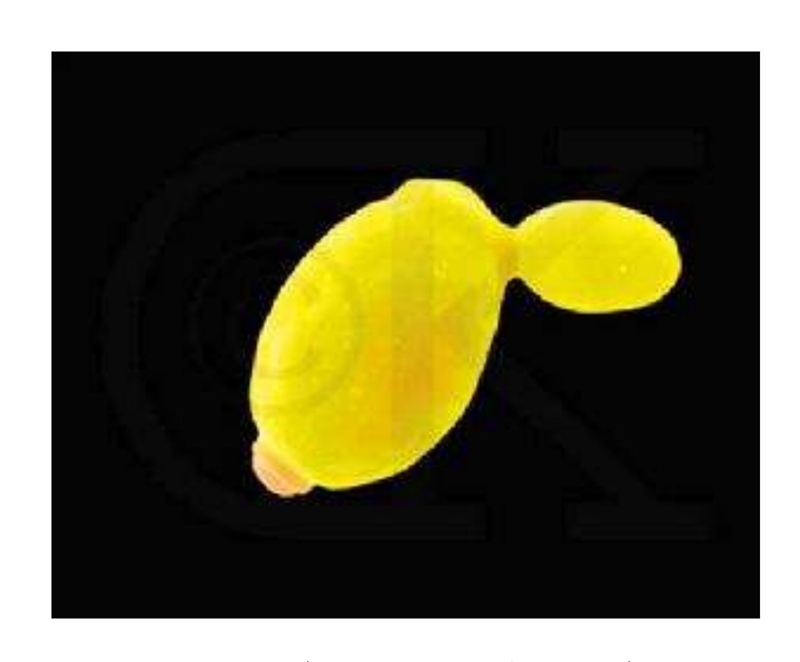
2.细菌



大肠杆菌

- 基因结构简单，培养方便，生长快，进行基因定位简便易行。

3.真菌： —— 酵母

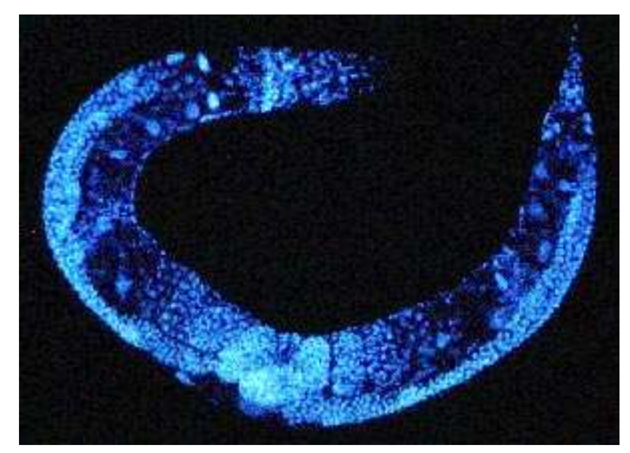


酿酒酵母、裂殖酵母

- 单细胞真菌，生长迅速易于遗传操作。

动物?

4.线虫



荧光显微镜下的秀丽线虫



秀丽线虫：2002'诺贝尔生物医学奖的新宠

- 线虫通身透明，生命周期3天，繁殖快；
- 个体细胞数恒定：
  - 幼虫含有556个体细胞和2个原始生殖细胞；
  - 雌雄同体成虫成熟后含有959个体细胞和2000个生殖细胞，而较少见的雄性成虫则只有1031个体细胞和1000个生殖细胞。

5.果蝇



左侧为雌性，右侧为雄性

- 节肢动物；
- 是重要的遗传学实验动物
- 。基因进化保守，与人类基因的同源性较高。

6.小鼠



- 胎生羊膜哺乳动物。
- 小鼠和人类基因组的高度同源，生理生化及发育过程基本相同，对环境和药物的反应也及其相似，所以**小鼠已成为建造人类疾病相关模型及研究发病机制的最重要实验动物**。

7.斑马鱼



- 在整个发育过程中，身体几乎透明，用于快速寻找调控发育和组织发生的基因；
- 其基因数目与人类的相近，许多基因与人类的基因存在一一对应关系。

植物?



8、拟南芥

- 基因组小（5对染色体，基因组长1.42*10^5kb），利于基因定位和测序；
- 植株小，生活周期短（6周）；
- 2000年，拟南芥成为第一个基因组被完整测序的植物。